SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF 490500
490501

Σ 75

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. INTENDED USE

The SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test is intended for the qualitative evaluation of aberrant S-Phase induction in cervical cytology specimens collected in SurePath® Preservative Fluid. The test results provide adjunctive information for cervical cytology diagnosis.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Minichromosome maintenance (MCM) proteins play an essential role in eukaryotic DNA replication. Each of the MCM proteins has DNA-dependent ATPase motifs in their highly conserved central domain. Levels of MCM proteins generally increase in a variable manner as normal cells progress from G0 into the G1/S phase of the cell cycle. Topoisomerase II alpha (TOP2A) is an essential nuclear enzyme involved in DNA replication and is a target for many anti-cancer drugs used for cancer therapy. Decreased expression of TOP2A is a predominant mechanism of resistance to several chemotherapeutic agents. A significant variation in the range of expression of this protein has been noted in many different tumors. TOP2A is predominant in proliferating cells and is modified in M phase by phosphorylation at specific sites, which is critical for mitotic chromosome condensation and segregation.

ProEx™ C Antibody Cocktail contains mouse monoclonal anti-MCM2 and anti-TOP2A purified from tissue culture supernatant and diluted in buffered saline solution containing protein stabilizers and 0.09% sodium azide.

3. PRINCIPLES OF PROCEDURE

The SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test kit contains an antibody cocktail, detection and counterstain reagents necessary to complete a three-step manual or automated immunocytochemical staining procedure for routinely prepared thinlayer cervical specimens. Following incubation of the sample with a proprietary, mouse antibody cocktail, selective monoclonal antibody binding, indicative of a positive test, is visualized using a unique, ready-to-use, enzyme-linked antibody chromogen system. The enzyme reagent is a secondary goat anti-mouse, horseradish peroxidase conjugate linked to a dextran polymer backbone. Addition of a specific chromogen results in formation of a visible chromogenic product localized at the antigen-antibody binding sites. The specimen is then counterstained with hematoxylin, a bluing agent is applied and the slide is coverslipped. Results are interpreted using a light microscope. A positive result, indicative of high-grade cervical disease, is achieved when the nucleus in cells of interest stain brown.

A reference gallery of potentially positive slides may be created using automated imaging equipment. The gallery then can be reviewed to determine a positive result or negative result.

The SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test is applicable for both manual and automated staining.

4. REAGENTS PROVIDED

The following materials are included, which are, sufficient for 75 thinlayer preparations:

Vial No.	Description	
1a	**Peroxidase-Block:** Buffered hydrogen peroxide plus stabilizer and proprietary components	2-8°C
1b	**Protein Block:** Purified casein plus proprietary combination of proteins in modified PBS with preservative and surfactant	2-8°C
2	**Antibody Cocktail:** Ready-to-use monoclonal antibody cocktail supplied in TRIS buffered solution with Tween 20, pH 7.4. Contains stabilizing proteins and anti-microbial agent.	2-8°C
3a	**Mouse Probe:** Binds to mouse monoclonal antibodies	2-8°C
3b	**Polymer Reagent:** Polymer conjugated with horseradish peroxidase that binds to Mouse Probe Reagent	2-8°C
4a	**DAB Buffer Substrate:** Substrate buffer used in the preparation of the DAB chromogen	2-8°C
4b	**DAB:** 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution	2-8°C
5	**Hematoxylin:** Aqueous based Mayer's Hematoxylin	15-30°C
6	**Bluing Agent:** Tris buffered saline, pH 7.4 with Tween 20 and 0.09% NaN_3	15-30°C

5. MATERIALS AND REAGENTS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Absorbent Wipes
- SureDetect™ SiHa Cell Line – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Deionized or Distilled Water
- Ethanol (95% and 100%)
- Glass Coverslips
- Gloves
- Humid Chamber
- Light Microscope (10x, 20x (optional), 40x objectives)
- Mounting Media
- Pipettes and Pipette Tips (capable of delivering 20µl, 200µl and 1000µl volumes)
- SureDetect™ Slide Preparation Buffer 10X – REF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Pretreatment Buffer
- Staining Jars or Baths
- Timer (capable of 1-60 minute intervals)
- Tris Buffered Saline (TBS)
- Tween 20
- Universal Mouse IgG Negative Control
- Vortexer
- Xylene or Xylene Substitutes
- Steamer/ waterbath

6. WARNINGS

Xn - Harmful	Chloral hydrate ***Risk phrases:*** *22 Harmful if swallowed.* ***Safety phrases:*** *23 Do not breathe gas/fumes/vapour/spray.* *25 Avoid contact with eyes.* *36 Wear suitable protective clothing.* *45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.* *60 This material and its container must be disposed of as hazardous waste.*
Xn - Harmful	3,3 diaminobenzidine ***Risk phrases:*** *22 Harmful if swallowed.* *40 Limited evidence of a carcinogenic effect.* ***Safety phrases:*** *23 Do not breathe gas/fumes/vapour/spray.* *36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.* *60 This material and its container must be disposed of as hazardous waste.*

7. PRECAUTIONS

7.1. For *In vitro* Diagnostic Use.

7.2. Prepared SurePath® slides must be placed into the pretreatment buffer as soon as they are prepared. The slides must remain in the pretreatment buffer for at least 1 hour, but not longer than 72 hours prior to immunocytochemistry.

7.3. Do not allow the slides to dry out at any time during the procedure. Slides that have been allowed to dry out during the procedure may increase background.

7.4. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) is classified as a suspected carcinogen with the potential risk of producing irreversible effects. Avoid physical contact and prolonged or repeated exposure. A chemical fume hood is highly recommended. Do not get in eyes, on skin or on clothing. Wash hands thoroughly after handling. DAB working solution should be prepared according to the package insert.

7.5. Some reagents in this kit contain sodium azide (NaN_3), a highly toxic chemical in pure form. Sodium azide may be fatal if swallowed or absorbed through skin. These reagents are harmful if inhaled. These reagents are hazardous solids. Causes irritation to skin, eyes and respiratory tract. Affects central nervous system, kidneys and cardiovascular system. Although not classified as hazardous at product concentrations, build-ups of sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build-up in plumbing.

7.6. Hematoxylin and Bluing agent: These regents are harmful if swallowed. Hematoxylin and Bluing agents are eye, skin and respiratory irritants.

7.7. Specimens and all materials exposed to specimens should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.8. Minimize microbial contamination of reagents to avoid nonspecific staining.

7.9. Incubation times, temperatures or methods other than those specified may give erroneous results.

7.10. Reagents have been diluted for optimal performance. Further dilution may result in loss of antigen staining.

7.11. Kit components are lot specific. Do not substitute kit components with different manufactured lot numbers. Lot numbers appear on packaging labels.

7.12. Do not use the SurePath® with ProEx™ C Test kit after the expiration date stamped on the package. The user must validate conditions if reagents are stored under any conditions other than those specified in the package insert.

7.13. There are no obvious signs to indicate degradation of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed, which cannot be explained by variations in laboratory procedures or a problem with the SurePath® with ProEx™ C Test kit is suspected, contact TriPath Imaging technical support.

7.14. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid reagent contact with eyes and skin. Refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.

7.15. The SurePath® with ProEx™ C Test is intended for use with cervical cytology specimens collected in SurePath® Preservative Fluid. Compatibility with conventional and monolayer preparations other than SurePath® has not been evaluated.

8. INSTRUCTIONS FOR USE

8.1. Specimen Preparation

8.1.1. Consult the Operator Manual for the SurePath® PrepStain System for instructions regarding the preparation of slides from residual SurePath® cervical cytology specimens.

8.1.2. Add 8mL of SurePath® Preservative Fluid to the residual sample in the SurePath® vial (approx. 2 mLs). The diluted sample should be processed on the BD PrepMate™ using the standard technique and on the PrepStain.

8.1.3. Prepared SurePath® slides must be placed into the SureDetect™ Slide Preparation Buffer as soon as they are prepared (Refer to the SureDetect™ Slide Preparation Buffer 10X for directions on preparation of a working slide solution). The slides must remain in the buffer for at least 1 hour, but not longer than 72 hours prior to immunocytochemistry.

8.1.4. An epitope retrieval procedure must be used for optimal kit performance. This procedure involves soaking prepared slides in a working solution of SureDetect™ Slide Preparation Buffer for a minimum of 1 hour at room temperature followed by heating slides in the pretreatment buffer to 95°C. Slides are held at 95°C for 15 minutes and are allowed to cool at room temperature for 20 minutes. The use of a calibrated waterbath or vegetable steamer capable of maintaining the required temperature is recommended. Laboratories located at higher elevations should determine the best method of maintaining the required temperature. The staining procedure should be initiated immediately following epitope retrieval and cool down. Deviations from the described procedure may adversely affect results.

8.2. Reagent Preparation

8.2.1. Prepare the following reagents prior to staining.

8.2.2. Tris Buffered Saline with 0.05% Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. Prepare TBS according to manufacturer's specifications.

8.2.2.2. If not already present in TBS, add Tween 20 to a final concentration of 0.05%.

8.2.3. Substrate-Chromogen Solution (DAB) (volume sufficient for 5 slides)

8.2.3.1. Transfer 1mL of DAB Substrate Buffer (vial 4a) to a test tube.

8.2.3.2. Add one drop (20 – 30µL) of DAB Chromogen (vial 4b). Mix thoroughly and apply to slides with a pipette.

8.2.3.3. Prepare Substrate-Chromogen solution fresh daily.

8.2.3.4. Staining quality is not affected by precipitate that may develop in the solution.

9. STAINING PROTOCOL (Performed at Room Temperature, 20-25°C)

9.1. Staining Procedural notes

9.1.1. Read all these instructions carefully and become familiar with all components prior to use (see Precautions).

9.1.2. All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25°C) prior to immunostaining.

9.1.3. All incubations should be performed at room temperature unless noted.

9.1.4. Do not allow slides to dry out during the staining procedure. Dried cellular preparations may display increased non-specific staining. Protect slides that may be exposed to drafts. Slides should be placed in a humid chamber for prolonged incubations.

9.2. Epitope Retrieval

9.2.1. Place prepared slides in a coplin jar containing a working solution of SureDetect™ Slide Preparation buffer for a minimum of 1 hour up to a maximum of 72 hours.

9.2.2. Incubate in a waterbath or steamer for 15 minutes at 95°C.

9.2.3. Remove the entire coplin jar with slides from the waterbath or steamer and allow slides to cool in the buffer for 20 minutes.

9.2.4. Rinse the slides with deionized H_2O and transfer to a clean coplin jar containing TBST.

9.3. Blocking Reagent

9.3.1. Tap off excess buffer.

9.3.2. Load slides into a prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.3.3. Apply 200µL Peroxidase Block reagent (vial 1a) to cover the cell deposition area.

9.3.4. Incubate 5 minutes (±1 minute).

9.3.5. Rinse slides in TBST, 3 changes, 2 minutes each.

9.4. Protein Block

9.4.1. Tap off excess buffer.

9.4.2. Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.4.3. Apply 200µL of Protein Block (vial 1b) to completely cover cell deposition area.

9.4.4. Incubate 5 minutes (±1 minute).

9.4.5. DO NOT RINSE.

9.5. Primary Antibody Cocktail

9.5.1. Tap off excess Protein Block.

9.5.2. Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.5.3. Apply 200µL ProEx™ C Ab Cocktail (vial 2) to completely cover cell deposition area.

9.5.4. Incubate 30 minutes at room temperature.

9.5.5. Rinse each slide individually with TBST using a wash bottle (do not focus the flow directly on the cell deposition area). Load slides into a slide rack.

9.5.6. Rinse slides in TBST, 3 changes, 2 minutes each.

9.6. Detection Chemistry

9.6.1. Tap off excess buffer.

9.6.2. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.6.3. Apply 200µL Mouse Probe Reagent (vial 3a) to completely cover cell deposition area.

9.6.4. Incubate 20 minutes (±1 minute).

9.6.5. Rinse slides in TBST, 3 changes, 2 minutes each.

9.6.6. Tap off excess buffer.

9.6.7. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.6.8. Apply 200 µL of Polymer Reagent (vial 3b) to cover cell deposition area.

9.6.9. Incubate for 20 minutes (±1 minute).

9.6.10. Rinse slides in TBST bath, 3 changes, 2 minutes each.

9.6.11. Tap off excess buffer.

9.6.12. Load the slides into the prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.6.13. Apply 200µL of Substrate-Chromogen solution (DAB) completely cover cell deposition area.

9.6.14. Incubate for 5 minutes (±1 minute).

9.6.15. Rinse slides for 5 minutes in deionized H_2O.

9.7. Counterstain

9.7.1. Rinse slides in TBST, 1 change for 2 minutes.

9.7.2. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.7.3. Apply 200µL of Hematoxylin counterstain (vial 5) to completely cover cell deposition area.

9.7.4. Incubate for 1 minute (±10 seconds).

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.7.5. Rinse slides for 3 minutes in running H_2O.

9.7.6. Load slides into prepared humidity chamber (filled with water moistened paper towels or gauze).

9.7.7. Blue slides by applying 200µL Bluing Agent (vial 6) for 1 minute (±10 seconds).

9.7.8. Repeat running water rinse for 1 minute.

9.8. Mounting

9.8.1. Immerse slides in 95% ethanol, 1 minute or 25 dips.

9.8.2. Immerse slides in absolute alcohol, 4 changes, 1 minute each or 25 dips.

9.8.3. Clear with xylene, 3 changes, 1 minute each or 25 dips.

9.8.4. Coverslip slides with non-aqueous, permanent mounting media using glass coverslips.

10. STABILITY

10.1. When stored at recommended temperatures, unopened reagent vials are stable until the expiration date indicated on the vial.

10.2. Once opened, reagents are stable for thirty days when stored at recommended temperatures.

11. QUALITY CONTROL

11.1. Variability in results is often derived from differences in specimen handling which deviates from recommended test procedures. Consult the proposed quality control guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry* for additional information.

11.2. SureDetect™ SiHa Cell Control is available as a positive control from TriPath Imaging, Inc. Each vial contains a cervical cancer cell line, which is processed in a similar manner as the clinical specimens. A universal mouse IgG negative control can be used as a negative control. A positive and negative control slide should be included in each staining procedure. The staining results should be used as an indication of the validity of the staining run.

12. INTERPRETATION OF STAINING

12.1. Patient and Control Specimens: A cytotechnologist or pathologist should evaluate the stained slides using a light microscope. Cells can be reviewed manually or stored in an electronic image gallery derived from a light microscope.

12.2. Control Slides: The positive and negative control slides should be examined prior to the review of patient specimens to ascertain that all reagents functioned properly. The presence of a brown reaction product (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) in the nuclei of the SiHa Cell Control slide stained with the SurePath® with ProEx™ C Test is indicative of positive reactivity. The universal mouse IgG negative control slide stained with the SurePath® with ProEx™ C Test should have no brown staining nuclei and should show staining only from the hematoxylin counterstain.

12.3. Scoring of slides is a 4-step process.

Step 1: Is the specimen adequate?
The Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) states, "An adequate liquid-based preparation should have an estimated minimum of at least 5000 well-visualized/well-preserved squamous cells." The same criteria should be applied to SurePath® with ProEx™ C slides. However, as with a routine Pap preparation, any specimen with abnormal cells, which is exhibiting a positive molecular reaction, is, by definition, satisfactory for evaluation. If the answer at this step is "yes", proceed to the next step, if the answer is "no" the result is ***Unsatisfactory for Evaluation***.

Step 2: Is there moderate to intense brown nuclear staining in epithelial cells?
To answer "yes" to this step look for brown staining that is easily visualized. If just a faint amount, or "blush", of brown is seen this is not enough to warrant a rendering of positive. If no brown nuclear stain is seen, the result is reported as ***Negative***. If adequate brown stain is visualized, proceed to the next step.

Step 3: Is the cell with nuclear brown staining a squamous or glandular cell?
If the answer is yes, proceed to the next step. If the answer is no, this is a ***Negative*** test result.

Step 4: Is the cell ≥ ASC (atypical squamous cell) or AGC (atypical glandular cell)?
Use the same morphological criteria outlined in The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) to determine if the squamous cell containing the brown nucleus is ≥ ASC (atypical squamous cells). If the cell is considered ≥ASC (or ≥AGC) then this is a ***Positive*** test result. This includes ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, and cancer. If the cell is glandular in appearance the TBS criteria for determining if a cell is ≥ AGC (atypical glandular cells) applies. This includes endocervical AGC, endometrial AGC, AIS, and adenocarcinoma. If the cell in question is consistent with NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy) this is a ***Negative*** test result.

13. REFERENCES

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. GLOSSARY OF SYMBOLS

REF	Catalog number
IVD	For *in vitro* diagnostic use
	Consult instructions for use
Σ	Contains 75 tests
	Caution, consult accompanying document
	Storage Temperature Limitations
LOT	Batch Code
	Use by YYYY-MM-DD or YYYY-MM
	Manufacturer

TECHNICAL SUPPORT

USA
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com
1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Australian Representative:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde, NSW 2113 Australia

Developed with technology from Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

and MILLENNIUM™ are trademarks of Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Detection Reagents supplied by

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® is a product and registered trademark of TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate are products and trademarks of TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. VERWENDUNGSZWECK

Der SurePath® mit ProEx™ C immunzytochemische Test ist für den qualitativen Nachweis einer abweichenden S-Phasen-Induktion in zervikalen, in SurePath® Konservierungslösung gesammelten Zytologieproben zu verwenden. Die Testergebnisse liefern begleitende Daten für die zytologische Zervixdiagnostik.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Bei der eukaryoten DNA-Replikation spielen die MCM-Proteine („minichromosome maintenance proteins") eine wichtige Rolle. Jedes MCM-Protein weist in seiner hoch konservierten zentralen Domäne DNA-abhängige ATPase-Motive auf. Normalerweise steigen die Konzentrationen des MCM-Proteins beim Übergang normaler Zellen aus der G0- in die G1/S-Phase des Zellzyklus unterschiedlich stark an. Topoisomerase II alpha (TOP2A) ist ein wichtiges, an der DNA-Replikation beteiligtes nukleäres Enzym und das Zielprotein vieler gängiger Krebstherapeutika. Bei Resistenz gegen diverse chemotherapeutische Wirkstoffe ist die Expression von TOP2A zumeist vermindert. Signifikante Unterschiede in der Expression dieses Proteins wurden bei vielen verschiedenen Tumoren beobachtet. TOP2A ist in proliferativen Zellen vorherrschend und in der M-Phase durch Phosphorylierung an bestimmten Stellen modifiziert; diese Modifikationen sind wesentlich für die mitotische Chromosomenkondensation und -segregation.

Der ProEx™ C Antikörper-Cocktail enthält gereinigtes, mit gepufferter Kochsalzlösung verdünntes monoklonales Anti-MCM2 und Anti-TOP2A (Maus) aus Gewebekulturüberstand sowie Proteinstabilisatoren und 0,09 % Natriumazid.

3. VERFAHRENSPRINZIP

Der SurePath® mit ProEx™ C immunzytochemische Testkit enthält neben einem Antikörper-Cocktail alle für manuelle oder automatische immunzytochemische Drei-Schritt-Färbeverfahren an routinemäßig verarbeiteten Dünnschicht-Zervixproben erforderlichen Nachweis- und Gegenfärbungsreagenzien. Nach Inkubation der Probe mit einem proprietären Antikörper-Cocktail (Maus) wird die ein positives Testergebnis anzeigende selektive Bindung an den monoklonalen Antikörper durch ein einzigartiges, gebrauchsfertiges enzymgebundenes Antikörper-Chromogen-System dargestellt. Bei dem Enzymreagenz handelt es sich um ein sekundäres, an einen Dextranpolymer-Backbone gekoppeltes Anti-Maus-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ziege). Der Zusatz eines spezifischen Chromogens führt zur Bildung eines sichtbaren chromogenen Reaktionsprodukts an den Antigen-Antikörper-Bindungsstellen. Anschließend wird die Probe mit Hämatoxylin gegengefärbt, ein Bläuungsmittel zugesetzt und der Objektträger mit einem Deckglas versehen. Die Ergebnisse werden mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Ein positives Ergebnis liegt bei einer Braunfärbung des Kerns der ausgewaehlten Zellen vor und zeigt eine hochgradige Zervixerkrankung an.

Mittels automatischer bildgebender Geräte kann eine Katalog mit Referenzbildern potenziell positiver Objektträger erstellt werden. Dieser Katalog kann bei der Entscheidung, ob ein positives oder negatives Ergebnis vorliegt, herangezogen werden.

Der SurePath® mit ProEx™ C immunzytochemische Test eignet sich für manuelle und automatische Färbeverfahren.

4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Im Lieferumfang enthalten sind folgende, für 75 Dünnschicht-Präparate ausreichende Materialien:

Gefäß Nr.	Beschreibung	
1a	**Peroxidasehemmer:** Gepuffertes Wasserstoffperoxid, enthält einen Stabilisator und geschützte Komponenten	2–8 °C
1b	**Proteinhemmer:** Gereinigtes Kasein, enthält eine geschützte Proteinkombination in modifizierter PBS mit Konservierungsmittel und oberflächenaktiver Substanz	2–8 °C
2	**Antikörper-Cocktail:** Gebrauchsfertiger Cocktail aus monoklonalen Antikörpern in TRIS-gepufferter Lösung mit Tween 20, pH 7,4. Enthält Stabilisierungsproteine und einen antimikrobiellen Wirkstoff.	2–8 °C
3a	**Sonde (Maus):** Bindet sich an monoklonale Mausantikörper	2–8 °C
3b	**Polymerreagenz:** Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer, bindet sich an Sondenreagenz (Maus)	2–8 °C
4a	**DAB-Puffersubstrat:** Substratpuffer zum Ansetzen des DAB-Chromogens	2–8 °C
4b	**DAB:** 3,3'-Diaminobenzidin-Chromogenlösung	2–8 °C
5	**Hematoxylin:** Hämatoxylin nach Mayer auf wässriger Basis	15–30 °C
6	**Bläuungsmittel:** Tris-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4, mit Tween 20 und 0,09 % NaN_3	15–30 °C

5. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- Absorbierende Tücher
- SureDetect™ SiHa Zelllinie – Ref. Nr. 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Ethanol (95 % und 100 %)
- Deckgläser
- Handschuhe
- Feuchtigkeitskammer
- Lichtmikroskop (Objektive mit 10facher, 20facher (optional) und 40facher Vergrößerung)
- Eindeckmittel
- Pipetten und Pipettenspitzen (geeignet für die Abgabe von Volumina von 20 µL, 200 µL und 1000 µL)
- SureDetect™ Puffer zur Objektträgerpräparation 10X – Ref.Nr. 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Vorbehandlungspuffer
- Färbeschalen oder -wannen
- Zeitmesser (muss Intervalle von 1–60 Minuten anzeigen können)
- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS, Tris Buffered Saline)
- Tween 20
- Universelle Maus-IgG Negativkontrolle
- Vortexer
- Xylol oder Xylolersatz
- Dampfkocher/Wasserbad

6. WARNHINWEISE

Xn – Gesundheitsschädlich	Chloralhydrat ***Risikosätze:*** *22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.* ***Sicherheitssätze:*** *23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen.* *25 Berührung mit den Augen vermeiden.* *36 Geeignete Schutzkleidung tragen.* *45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort den Arzt hinzuziehen.* *60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.*
Xn – Gesundheitsschädlich	3,3'-Diaminobenzidin ***Risikosätze:*** *22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.* *40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.* ***Sicherheitssätze:*** *23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen.* *36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.* *60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.*

7. VORSICHTSMASSNAHMEN

7.1. Zur *In-vitro*-Diagnostik

7.2. Präparierte SurePath® Objektträger sofort nach dem Präparieren in den Vorbehandlungspuffer einlegen. Die Objektträger vor immunzytochemischen Färbungen mindestens eine Stunde, aber höchstens 72 Stunden im Vorbehandlungspuffer belassen.

7.3. Objektträger während der Verarbeitung nicht austrocknen lassen. Bei Objektträgern, die während des Verfahrens ausgetrocknet sind, kann eine erhöhte Hintergrundfärbung auftreten.

7.4. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde als potenziell karzinogen mit Risiko irreversibler Schäden eingestuft. Berührung und länger andauernde oder wiederholte Exposition vermeiden. Ein chemischer Dunstabzug wird dringend empfohlen. Berührung mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Nach Verwendung die Hände gründlich waschen. Die DAB Arbeitslösung gemäß den Angaben in der Packungsbeilage ansetzen.

7.5. Einige Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Das Verschlucken von Natriumazid oder die Aufnahme durch die Haut kann zum Tode führen. Das Einatmen dieser Reagenzien ist gesundheitsschädlich. Es handelt sich dabei um gesundheitsschädliche Feststoffe. Sie reizen Haut, Augen und Atmungsorgane. Schädigen das zentrale Nervensystem, die Nieren und das Herz-Kreislauf-System. Auch in den nicht als gefährlich eingestuften Konzentrationen in diesem Produkt kann Natriumazid mit Blei- oder Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen stets mit viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Aziden in den Leitungsrohren zu verhindern.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.6. Hämatoxylin und Bläuungsmittel: Das Verschlucken dieser Reagenzien ist gesundheitsschädlich. Hämatoxylin und Bläuungsmittel reizen Augen, Haut und Atmungsorgane.

7.7. Mit Proben und allen Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, ist so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Reagenzien niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhaut vermeiden. Falls es zu einem Kontakt der Reagenzien mit empfindlichen Bereichen gekommen ist, mit reichlich Wasser abspülen.

7.8. Die mikrobielle Kontamination der Reagenzien muss so gering wie möglich gehalten werden, um unspezifische Färbungen zu verhindern.

7.9. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten, -temperaturen bzw. -verfahren können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

7.10. Die Reagenzien wurden für eine optimale Leistung verdünnt. Eine weitere Verdünnung kann den Verlust der Antigenfärbung zur Folge haben.

7.11. Kitkomponenten sind chargenspezifisch und dürfen nicht durch Kitkomponenten mit anderen Herstellungschargennummern ausgetauscht werden. Die Chargennummern befinden sich auf den Verpackungsetiketten.

7.12. Das SurePath® mit ProEx™ C Testkit nach Ablauf des auf der Verpackung aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den in der Packungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, sind diese Bedingungen vom Anwender zu validieren.

7.13. Es gibt keine sichtbaren Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Daher sollten parallel zu den Patientenproben jeweils Positiv- und Negativkontrollen getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem SurePath® mit ProEx™ C Testkit hindeutet, ist der technische Kundendienst von TriPath Imaging zu verständigen.

7.14. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. Zusätzliche Informationen dem Material-Sicherheitsdatenblatt (MSDS) entnehmen.

7.15. Der SurePath® mit ProEx™ C Test sollte mit zervikalen Zytologieproben verwendet werden, die in SurePath® Konservierungslösung aufbewahrt wurden. Die Kompatibilität mit anderen konventionellen oder Einschicht-Präparaten wurde nicht untersucht.

8. GEBRAUCHSANLEITUNG

8.1. Vorbereitung der Probe

8.1.1. Anweisungen zum Präparieren von Objektträgern mit verbliebenem SurePath® Zervix-Zytologieprobenmaterial dem Benutzerhandbuch für das SurePath® PrepStain System entnehmen.

8.1.2. Zu der im SurePath® Gefäß verbliebenen Probe (etwa 2 ml) 8 ml SurePath® Konservierungslösung geben. Die verdünnte Probe mit der Standardtechnik auf dem BD PrepMate™ sowie auf dem PrepStain.

8.1.3. Präparierte SurePath® Objektträger unmittelbar nach dem Präparieren in den SureDetect™ Puffer zur Objektträgerpräparation einlegen (Hinweise zum Ansetzen einer Objektträger-Arbeitslösung der Packungsbeilage des SureDetect™ Puffers zur Objektträgerpräparation 10X entnehmen). Vor immunzytochemischen Verfahren müssen die Objektträger mindestens eine Stunde, aber höchstens 72 Stunden im Puffer verbleiben.

8.1.4. Für eine optimale Kitleistung ist eine Epitopdemaskierung zwingend erforderlich. Dieses Verfahren umfasst das mindestens 1stündige Eintauchen der präparierten Objektträger in eine Arbeitslösung aus SureDetect™ Puffer zur Objektträgerpräparation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Erhitzung der Objektträger in Vorbehandlungspuffer auf 95 °C. Die Temperatur der Objektträger wird 15 Minuten auf 95 °C gehalten, dann folgt eine 20minütige Abkühlung bei Raumtemperatur. Empfohlen wird die Verwendung eines kalibrierten Wasserbads oder Dampfkochers, um die geforderte Temperatur beizubehalten. Labors in größeren Höhenlagen sollten die beste Methode, die geforderte Temperatur beizubehalten, selbst ermitteln. Das Färbeverfahren sollte unmittelbar im Anschluss an die Demaskierung und Abkühlung erfolgen. Abweichungen vom beschriebenen Vorgehen können die Ergebnisse beeinträchtigen.

8.2. Ansetzen der Reagenzien

8.2.1. Folgende Reagenzien vor der Färbung ansetzen.

8.2.2. Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. TBS gemäß den Anweisungen des Herstellers ansetzen.

8.2.2.2. Falls im TBS noch nicht vorhanden, Tween 20 bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % zusetzen.

8.2.3. Substratchromogenlösung (DAB) (Volumen ausreichend für 5 Objektträger)

8.2.3.1. 1 ml DAB Substratpuffer (Gefäß 4a) in ein Teströhrchen geben.

8.2.3.2. Einen Tropfen (20–30 µl) DAB Chromogen (Gefäß 4b) zugeben. Gründlich mischen und mit einer Pipette auf die Objektträger aufbringen.

8.2.3.3. Substratchromogenlösung täglich frisch ansetzen.

8.2.3.4. Ein in der Lösung eventuell auftretendes Präzipitat beeinträchtigt die Färbung nicht.

9. FÄRBEPROTOKOLL (bei Raumtemperatur durchführen, 20–25 °C)

9.1. Verfahrenshinweise zu Färbung

9.1.1. Vor der Verwendung diese Anweisungen sorgfältig lesen und sich mit allen Komponenten vertraut machen (siehe Vorsichtsmaßnahmen).

9.1.2. Alle Reagenzien vor der Immunfärbung Raumtemperatur (20–25 °C) annehmen lassen.

9.1.3. Sofern nicht anders angegeben, alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.

9.1.4. Die Objektträger während des Färbeverfahrens nicht austrocknen lassen. Eingetrocknete Zellpräparate können eine erhöhte unspezifische Färbung aufweisen. Objektträger vor Zugluft schützen. Bei längeren Inkubationen die Objektträger in eine Feuchtigkeitskammer stellen.

9.2. Epitopdemaskierung

9.2.1. Die präparierten Objektträger für mindestens eine Stunde, aber höchstens 72 Stunden in eine Coplin-Küvette stellen, die eine Arbeitslösung aus SureDetect™ Puffer zur Objektträgerpräparation enthält.

9.2.2. In einem Wasserbad oder Dampfkocher mindestens 15 Minuten bei 95 °C inkubieren.

9.2.3. Die Coplin-Küvette mit den Objektträgern aus dem Wasserbad bzw. Dampfkocher nehmen und Objektträger 20 Minuten in Puffer abkühlen lassen.

9.2.4. Objektträger mit entionisiertem H_2O spülen und in eine saubere Coplin-Küvette mit TBST geben.

9.3. Blockierungsreagenz

9.3.1. Überschüssigen Puffer abklopfen.

9.3.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.3.3. 200 µl Peroxidase Blockierungsreagenz (Gefäß 1a) zugeben, um den Zellablagerungsbereich zu bedecken.

9.3.4. 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.

9.3.5. Objektträger viermal jeweils 2 Minuten in frischem TBST spülen.

9.4. Proteinhemmer

9.4.1. Überschüssigen Puffer abklopfen.

9.4.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.4.3. 200 µL Protein-Blockierungsreagenz (Gefäß 1b) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.

9.4.4. 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.

9.4.5. NICHT SPÜLEN.

9.5. Primär-Antikörper-Cocktail

9.5.1. Überschüssigen Proteinhemmer abklopfen.

9.5.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.5.3. 200 µl ProEx™ C Antikörper-Cocktail (Gefäß 2) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.

9.5.4. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

9.5.5. Jeden Objektträger einzeln mit TBST aus einer Waschflasche spülen (den Strahl nicht direkt auf den Zellablagerungsbereich richten). Objektträger auf ein Objektträgergestell stellen.

9.5.6. Objektträger viermal 2 Minuten in jeweils frischem TBST spülen.

9.6. Chemischer Nachweis

9.6.1. Überschüssigen Puffer abklopfen.

9.6.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.6.3. 200 µl Maus-Sondenreagenz (Gefäß 3a) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.

9.6.4. 20 Minuten (±1 Minute) inkubieren.

9.6.5. Objektträger viermal 2 Minuten in jeweils frischem TBST spülen.

9.6.6. Überschüssigen Puffer abklopfen.

9.6.7. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.6.8. 200 µl Polymerreagenz (Gefäß 3b) zugeben, um den Zellablagerungsbereich zu bedecken.

9.6.9. 20 Minuten (±1 Minute) inkubieren.

9.6.10. Objektträger viermal 2 Minuten in einem jeweils frischen TBST-Bad spülen.

9.6.11. Überschüssigen Puffer abklopfen.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.

779-05848-10(08) 2013-12

9.6.12. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.6.13. 200 µl Substratchromogenlösung zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.

9.6.14. 5 Minuten (±1 Minute) inkubieren.

9.6.15. Objektträger 5 Minuten in entionisiertem H_2O spülen.

9.7. Gegenfärbung

9.7.1. Objektträger zweimal 2 Minuten in jeweils frischem TBST spülen.

9.7.2. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.7.3. 200 µl Hämatoxylin-Gegenfärbung (Gefäß 5) zugeben, um den Zellablagerungsbereich vollständig zu bedecken.

9.7.4. 1 Minute (±10 Sekunden) inkubieren.

9.7.5. Objektträger 3 Minuten unter fließendem Wasser spülen.

9.7.6. Objektträger in eine vorbereitete Feuchtigkeitskammer stellen, die mit Wasser angefeuchtete Papiertücher oder Gaze enthält.

9.7.7. Objektträger durch Zusatz von 200 µl Bläuungsmittel (Gefäß 6) 1 Minute (±10 Sekunden) bläuen.

9.7.8. Erneut 1 Minute unter fließendem Wasser spülen.

9.8. Fixieren

9.8.1. Objektträger 1 Minute oder 25mal in 95 %iges Ethanol eintauchen.

9.8.2. Objektträger fünfmal 1 Minute oder 25mal in jeweils frischen absoluten Alkohol eintauchen.

9.8.3. Viermal 1 Minute oder 25mal in jeweils frisches Xylol eintauchen.

9.8.4. Objektträger mit einem nicht-wässrigen, permanenten Fixiermittel und Deckgläsern bedecken.

10. STABILITÄT

10.1. Ungeöffnete Reagenziengefäße sind bei Raumtemperatur bis zu dem auf dem Gefäß aufgedruckten Verfalldatum stabil.

10.2. Nach dem Öffnen sind die Reagenzien für die Dauer von 30 Tagen stabil, sofern sie bei der jeweils empfohlenen Temperatur aufbewahrt werden.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

11.1. Abweichende Ergebnisse treten zumeist aufgrund einer Probenbehandlung auf, die von den empfohlenen Testverfahren abweicht. Weitere Angaben bitte den Empfehlungen zur Qualitätskontrolle des Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry* entnehmen.

11.2. SureDetect™ SiHa Kontrollzelllinien sind als Positivkontrolle über TriPath Imaging, Inc. erhältlich. Jedes Gefäß enthält eine Zervixkarzinom-Zelllinie, die analog zu den klinischen Proben verarbeitet wird. Als Negativkontrolle eignet sich eine universelle Maus-IgG-Negativkontrolle. Bei jedem Färbeverfahren sollte je ein Objektträger mit einer Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden. Die Färbungsergebnisse sollten benutzt werden um die Qualitaet des Färbedurchlauf anzuzeigen.

12. AUSWERTUNG DER FÄRBUNG

12.1. Patienten- und Kontrollproben: Die gefärbten Objektträger sind durch einen Zytotechniker oder Pathologen mit einem Lichtmikroskop auszuwerten. Die Zellen können manuell überprüft oder in einer mit einem Lichtmikroskop generierten elektronischen Referenz-Bildkatalog abgespeichert werden.

12.2. Kontrollobjektträger: Zur Bestätigung des korrekten Funktionierens aller Reagenzien die Positiv- bzw. Negativkontrollen vor den Patientenproben auswerten. Ein braunes Reaktionsendprodukt (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, DAB) in den Zellkernen der mit dem SurePath® mit ProEx™ C Test gefärbten SiHa Kontrollzelllinien zeigt die positive Reaktivität an. Der mit SurePath® mit ProEx™ C Test gefärbte Objektträger mit der universellen Maus-IgG-Negativkontrolle darf keine Braunfärbung der Zellkerne, sondern nur eine Färbung durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung aufweisen.

12.3. Die Auswertung der Objektträger ist ein Prozess in vier Schritten.

Schritt 1: Ist die Probe geeignet?
Laut dem „The Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.)" sollte „ein geeignetes Flüssigkeitszytologie-Präparat mindestens etwa 5000 gut dargestellte/gut erhaltene Plattenepithelzellen aufweisen." Dieses Kriterium ist auch auf die Objektträger beim SurePath® mit ProEx™ C-Verfahren anzuwenden. Allerdings eignet sich, wie bei routinemäßigen Pap-Abstrichen, für die Auswertung *per definitionem* jede abnormale Zellen aufweisende Probe, bei der eine positive molekulare Reaktion auftritt. Kann die Frage bei diesem Schritt mit „Ja" beantwortet werden, mit dem nächsten Schritt fortfahren; bei „Nein" ist das Ergebnis ***nicht für eine Auswertung geeignet***.

Schritt 2: Weisen die Epithelzellen eine mäßige bis intensive Braunfärbung im Nukleus auf?
Um diese Frage mit „Ja" beantworten zu können, nach einer deutlich sichtbaren Braunfärbung Ausschau halten. Nur eine leichte Tönung, also ein „Hauch" von Braun, reicht nicht aus, um das Ergebnis als positiv zu bewerten. Tritt keine nukleäre Braunfärbung auf, ist das Ergebnis ***negativ.*** Falls eine angemessene Braunfärbung sichtbar ist, mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Schritt 3: Handelt es sich bei der Zelle, die die nukleäre Braunfärbung aufweist, um entweder eine Zelle des Plattenepithels oder eine Drüsenzelle?
Kann diese Frage bejaht werden, mit dem nächsten Schritt fortfahren. Bei Nein ist das Testergebnis ***negativ***.

Schritt 4: Handelt es sich bei der Zelle um eine ≥ ASC (atypical squamous cell, atypische Plattenepithelzelle) oder eine AGC (atypical glandular cell, atypische Drüsenzelle)?
Die im „Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.)" angegebenen morphologischen Kriterien zugrundelegen, um zu ermitteln, ob es sich bei der den einen braunen Zellkern aufweisenden Plattenepithelzellen um ≥ ASC (atypische Plattenepithelzellen) handelt. Kann die Zelle als ≥ ASC (oder ≥ AGC) klassifiziert werden, ist das Testergebnis ***positiv***. Diese Zelltypen schließen ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL und Krebs ein. Weist die Zelle ein eher glanduläres Erscheinungsbild auf, sind die TBS-Kriterien für die Definition von ≥ AGC (atypischen Drüsenzellen) anzuwenden. Diese umfassen endozervikales AGC, endometranes AGC, AIS und Adenokarzinom. Ein ***negatives*** Testergebnis liegt auch dann vor, wenn das Kriterium NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy, keine intraepitheliale Läsion oder Malignität) auf die fragliche Zelle zutrifft.

13. LITERATURANGABEN

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. LEGENDE DER SYMBOLE

REF	Katalognummer
IVD	Zur *In-vitro*-Diagnostik
	Gebrauchsanleitung beachten
Σ	Enthält 75 Tests
	Vorsicht, Begleitpapiere beachten
	Zulässiger Temperaturbereich für die Aufbewahrung
LOT	Chargenbezeichnung
	Bis JJJJ-MM-TT oder JJJJ-MM verbrauchen
	Hersteller

TECHNISCHER KUNDENDIENST
USA
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP
Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Mit Technologie von Millennium Pharmaceuticals, Inc. entwickelt

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ sind Warenzeichen der Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

Nachweisreagenzien von

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® ist ein Erzeugnis und ein eingetragenes Warenzeichen der TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate sind Erzeugnisse und Warenzeichen der TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. DOMAINE D'UTILISATION

Le test immunocytochimique SurePath® avec ProEx™ C est destiné à l'évaluation qualitative de l'induction aberrante de la phase S dans les échantillons cytologiques cervicaux recueillis dans le liquide conservateur SurePath®. Les résultats du test apportent des informations complémentaires aux diagnostics de cytologie cervicale.

2. RÉSUME ET EXPLICATION

Les protéines MCM (mini chromosome maintenance) jouent un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN eucaryote. Toutes les protéines MCM possèdent des motifs ATPase ADN-dépendants dans leurs domaines centraux hautement conservés. Les concentrations des protéines MCM augmentent en général de façon variable tandis que les cellules normales passent de la phase G0 à la phase G1/S du cycle cellulaire. La topoisomérase II alpha (TOP2A) est une enzyme nucléaire essentielle impliquée dans la réplication de l'ADN et elle constitue la cible de nombreux médicaments anticancéreux utilisés dans le cadre des thérapeutiques anticancéreuses. Une expression diminuée de la TOP2A constitue un mécanisme prédominant de la résistance de plusieurs agents chimiothérapeutiques. Une variation significative de la gamme d'expression de cette protéine a été remarquée au niveau de nombreuses tumeurs. Le TOP2A est prédominante dans les cellules en cours de prolifération et elle est modifiée au cours de la phase M par phosphorylation au niveau de sites spécifiques, qui jouent un rôle critique dans la condensation et la ségrégation des chromosomes mitotiques.

Le mélange d'anticorps ProEx™ C contient des anticorps monoclonaux de souris anti-MCM2 et anti-TOP2A purifiés à partir d'un surnageant de culture tissulaire et dilués dans une solution saline tamponnée contenant des agents de stabilisation protéiques et de l'azide de sodium à 0,09 %.

3. PRINCIPES DE LA PROCEDURE

Le kit de test immunocytochimique SurePath® avec ProEx™ contient un mélange d'anticorps, les réactifs de détection et de coloration de contraste, nécessaires à la réalisation d'une procédure de coloration immunocytochimique manuelle ou automatique d'échantillons cervicaux sur couche mince préparés en routine. Après incubation de l'échantillon avec un mélange propriétaire d'anticorps de souris, une liaison sélective avec un anticorps monoclonal, indicative d'un test positif, est visualisée à l'aide d'un système chromogène d'anticorps prêt à l'emploi lié à une enzyme. Le réactif enzymatique est constitué d'un anticorps de chèvre anti-souris secondaire, conjugué à la peroxydase de raifort, fixé sur un squelette en polymère de dextran. L'addition d'un chromogène spécifique se traduit par la formation d'un produit chromogène visible localisé au niveau des sites de liaison antigène-anticorps. L'échantillon fait alors l'objet d'une coloration de contraste par l'hématoxyline, un agent bleuissant est appliqué sur la lame puis une lamelle est mise en place. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique. Un résultat positif, indicatif d'une lésion cervicale de grade élevé, est mis en évidence par la coloration en marron du noyau des cellules considérées.

Une galerie de référence comportant des lames potentiellement positives peut être créée à l'aide d'un appareil d'imagerie automatique. La galerie peut être examinée afin de déterminer si un résultat est positif ou négatif.

Le test immunocytochimique SurePath® avec ProEx™ C est utilisable avec les appareils de coloration manuels et automatiques.

4. RÉACTIFS FOURNIS

Les matériels suivants sont inclus dans le kit et permettent de réaliser 75 préparations sur couche mince.

Flacon n°	Description	
1a	**Blocage de la peroxydase :** peroxyde d'hydrogène tamponné plus des agents de stabilisation et des composés propriétaires	2–8 °C
1b	**Blocage des protéines :** caséine purifiée plus une combinaison propriétaire de protéines dans du PBS modifié avec agent de conservation et surfactant	2–8 °C
2	**Mélange d'anticorps :** mélange d'anticorps monoclonaux prêt à l'emploi dans une solution tamponnée de TRIS avec du Tween 20, à 7,4 de pH. Contient des protéines stabilisantes et un agent antimicrobien.	2–8 °C
3a	**Sonde de souris :** se lie à des anticorps monoclonaux de souris	2–8 °C
3b	**Réactif polymérique :** polymère conjugué avec de la peroxydase de raifort qui se lie au réactif sonde de souris	2–8 °C
4a	**Tampon substrat DAB :** tampon substrat utilisé au cours de la préparation du chromogène DAB	2–8 °C
4b	**DAB :** solution chromogène de 3,3'-diaminobenzidine	2–8 °C
5	**Hématoxyline :** hématoxyline de Mayer aqueuse	15–30 °C
6	**Agent bleuissant :** solution saline tamponnée de Tris, à 7,4 de pH avec du Tween 20 et du NaN_3 à 0,09 %	15–30 °C

5. MATÉRIELS ET RÉACTIFS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Tampons absorbants
- Lignée cellulaire SureDetect™ SiHa – RÉF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Eau désionisée ou distillée
- Éthanol (95 % et 100 %)
- Lamelles de verre
- Gants
- Chambre humide
- Microscope optique (objectifs 10x, 20x (en option), 40x)
- Milieu de montage
- Pipettes et embouts de pipettes (capables de délivrer des volumes de 20 µl, 200 µl et 1000 µl)
- Tampon de préparation pour lame porte-objet SureDetect™ 10X – RÉF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Tampon de prétraitement
- Bains ou cuves de coloration
- Horloge (capable de mesurer des durées de 1 à 60 minutes)
- Solution saline tamponnée de Tris (TBS)
- Tween 20
- Contrôle universel anti-IgG de souris
- Agitateur vortex
- Xylène ou substituts du xylène
- Étuve/bain-marie

6. AVERTISSEMENTS

Xn - Dangereux	Hydrate de chloral ***Avertissements relatifs aux risques :*** *22 Nocif en cas d'ingestion.* ***Avertissements relatifs à la sécurité :*** *23 Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/pulvérisations.* *25 Éviter tout contact avec les yeux.* *36 Porter des vêtements de protection appropriés.* *45 En cas d'accident ou de sensation de malaise, consulter immédiatement un médecin.* *60 Cette substance et son récipient doivent être mis au rebut comme les déchets à risque biologique.*
Xn - Dangereux	3,3-diaminobenzidine ***Avertissements relatifs aux risques :*** *22 Nocif en cas d'ingestion.* *40 Effet cancérogène suspecté : preuves insuffisantes.* ***Avertissements relatifs à la sécurité :*** *23 Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/pulvérisations.* *36/37 Porter des vêtements et des gants de protection appropriés.* *60 Cette substance et son récipient doivent être mis au rebut comme les déchets à risque biologique.*

7. PRECAUTIONS

7.1. Utilisation diagnostique *in vitro*.

7.2. Les lames SurePath® préparées doivent être placées dans le tampon de prétraitement dès qu'elles ont été préparées. Les lames doivent demeurer dans le tampon de prétraitement pendant au moins 1 heure, mais pas plus de 72 heures avant la procédure immunocytochimique.

7.3. Ne laisser les lames sécher à aucun moment au cours de la procédure. Les lames qui ont pu sécher pendant la procédure sont susceptibles de faire augmenter le bruit de fond.

7.4. La 3,3'-diaminobenzidine (DAB) est classée parmi les produits suspectés d'être cancérigènes qui présentent le danger potentiel de provoquer des effets irréversibles. Éviter tout contact physique ou exposition prolongée ou répétée. L'emploi d'une hotte aspirante est fortement recommandé. Ne pas projeter dans les yeux, sur la peau ou sur les vêtements. Se laver les mains soigneusement après manipulation. La solution de DAB de travail doit être préparée conformément aux indications de sa notice.

7.5. Certains réactifs de ce kit contiennent de l'azide de sodium (NaN_3), un produit chimique extrêmement toxique à l'état pur. L'azide de sodium peut être mortel en cas d'ingestion ou d'absorption à travers la peau. Ces réactifs sont nocifs en cas d'inhalation. Ces réactifs sont des solides présentant des dangers. Ils provoquent des irritations de la peau, des yeux et de l'appareil respiratoire. Ils affectent le système nerveux central, les reins et le système cardiovasculaire. Bien que non rangé parmi les composés présentant un danger aux concentrations du produit, les accumulations d'azide de sodium sont susceptibles de réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour donner des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter l'accumulation d'azides dans les canalisations.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.6. Hématoxyline et agent bleuissant : Ces réactifs sont nocifs en cas d'ingestion. L'hématoxyline et les agents bleuissants sont des irritants des yeux, de la peau et des voies respiratoires.

7.7. Les échantillons et tous les matériels exposés aux échantillons doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre des infections et éliminés conformément aux précautions en vigueur. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter de mettre en contact les réactifs et les échantillons avec la peau et les muqueuses. Laver à grande eau en cas de contact des réactifs avec des régions sensibles.

7.8. Minimiser la contamination microbienne de réactifs pour éviter les colorations non spécifiques.

7.9. Des durées d'incubation, des températures ou des méthodes autres que celles qui sont spécifiées peuvent conduire à des résultats erronés.

7.10. Les réactifs ont été dilués pour donner des performances optimales. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de coloration des antigènes.

7.11. Les éléments du kit sont spécifiques d'un lot. Ne pas remplacer les éléments d'un kit par d'autres provenant de lots dont les numéros sont différents. Les numéros de lot figurent sur les étiquettes du conditionnement.

7.12. Ne pas utiliser le test SurePath® avec ProEx™ C après la date de péremption figurant sur le conditionnement. L'utilisateur doit valider les conditions si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles qui sont spécifiées dans la notice.

7.13. Il n'existe aucun signe évident susceptible de signaler une dégradation de ce produit. Par conséquent, des contrôles négatif et positif doivent être traités de façon simultanée avec les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut pas s'expliquer par des variations dans les procédures du laboratoire ou si un problème avec le test SurePath® avec ProEx™ C Test est suspecté, contacter l'assistance technique TriPath Imaging.

7.14. Porter des vêtements de protection appropriés pour éviter le contact avec les yeux et la peau Pour plus d'informations, se référer aux Fiches de données de sécurité (MSDS).

7.15. Le test SurePath® avec ProEx™ C est destiné à être utilisé avec des échantillons cytologiques cervicaux recueillis dans du liquide conservateur SurePath®. La compatibilité avec les préparations conventionnelles et monocouches autre que le SurePath® n'a pas été évaluée.

8. MODE D'EMPLOI

8.1. Préparation des échantillons

8.1.1. Consulter le Manuel de l'opérateur du SurePath® PrepStain System pour obtenir des instructions relatives à la préparation des lames à partir des échantillons cytologiques cervicaux SurePath® résiduels.

8.1.2. Ajouter 8 ml de liquide conservateur SurePath® à l'échantillon résiduel dans le flacon SurePath® (environ 2 ml). L'échantillon dilué doit être traité sur le BD PrepMate™ à l'aide de la technique standard et sur le PrepStain.

8.1.3. Les lames SurePath® préparées doivent être placées dans le tampon de préparation pour lame porte-objet SureDetect™ dès qu'elles ont été préparées (se référer à la notice du tampon de préparation des lames porte-objet SureDetect™ 10X pour obtenir des indications sur le préparation d'une solution de travail). Les lames doivent demeurer dans le tampon pendant au moins 1 heure, mais pas plus de 72 heures avant la procédure immunocytochimique.

8.1.4. Une procédure de restauration de l'épitope doit être utilisée pour obtenir des performances optimales du kit. Cette procédure comporte le trempage des lames préparées dans une solution de travail de tampon de préparation des lames porte-objet SureDetect™ pendant un minimum de 1 heure à température ambiante suivi d'un chauffage des lames dans le tampon de prétraitement jusqu'à 95 °C. Les lames sont laissées à 95 °C pendant 15 minutes puis elles refroidissent à température ambiante pendant 20 minutes. L'emploi d'un bain-marie calibré ou d'une étuveuse à légumes capables de maintenir la température nécessaire est recommandé. Les laboratoires situés en altitude doivent déterminer la meilleure méthode permettant de maintenir la température nécessaire. La procédure de coloration doit être lancée immédiatement après la restauration de l'épitope et le refroidissement. Les déviations par rapport à la procédure décrite sont susceptibles d'affecter défavorablement les résultats.

8.2. Préparation des réactifs

8.2.1. Préparer les réactifs suivants avant la coloration.

8.2.2. Solution saline tamponnée de Tris avec du Tween 20 à 0,05 % (TBST)

8.2.2.1. Préparer le TBS conformément aux spécifications du fabricant.

8.2.2.2. S'il n'est pas déjà présent dans le TBS, ajouter du Tween 20 pour obtenir une concentration finale de 0,05 %.

8.2.3. Solution substrat-chromogène (DAB) (volume suffisant pour cinq lames)

8.2.3.1. Transférer 1 ml de tampon substrat DAB (flacon 4a) dans un tube à analyse.

8.2.3.2. Ajouter une goutte (20–30 µl) de chromogène DAB (flacon 4b). Mélanger soigneusement et appliquer sur les lames avec une pipette.

8.2.3.3. Préparer la solution substrat-chromogène quotidiennement.

8.2.3.4. La qualité de la coloration n'est pas affectée par le précipité qui est susceptible de se développer dans la solution.

9. PROTOCOLE DE COLORATION (réalisé à température ambiante, 20–25 °C)

9.1. Remarques concernant la procédure de coloration

9.1.1. Lire soigneusement toutes les instructions et se familiariser avec tous les éléments avant emploi (voir Précautions).

9.1.2. Tous les réactifs doivent s'équilibrer à température ambiante (20–25 °C) avant immunocoloration.

9.1.3. Toutes les incubations doivent se dérouler à température ambiante sauf mention contraire.

9.1.4. Ne pas laisser sécher les lames au cours de la procédure de coloration. Les préparations cellulaires desséchées peuvent présenter une coloration non spécifique accrue. Protéger les lames susceptibles d'être exposées aux courants d'air. Les lames doivent être placées dans une chambre humide pour des incubations prolongées.

9.2. Restauration de l'épitope

9.2.1. Placer les lames préparées dans une cuve de Coplin contenant la solution de travail de tampon de préparation des lames porte-objet SureDetect™ pendant un minimum de 1 heure jusqu'à un maximum de 72 heures.

9.2.2. Incuber au bain-marie ou à l'étuve pendant 15 minutes à 95 °C.

9.2.3. Retirer la cuve de Coplin avec les lames du bain-marie ou de l'étuve et laisser les lames refroidir dans le tampon pendant 20 minutes.

9.2.4. Rincer les lames avec de l'H_2O désionisée et les transférer dans une cuve de Coplin propre contenant du TBST.

9.3. Réactif de blocage

9.3.1. Tapoter pour éliminer le tampon en excès.

9.3.2. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.3.3. Appliquer 200 µl de réactif de blocage de la peroxydase (flacon 1a) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.

9.3.4. Incuber pendant 5 minutes (±1 minute).

9.3.5. Rincer les lames dans du TBST, à 3 reprises de 2 minutes chacune.

9.4. Blocage des protéines

9.4.1. Tapoter pour éliminer le tampon en excès.

9.4.2. Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.4.3. Appliquer 200 µl de réactif de blocage des protéines (flacon 1b) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.

9.4.4. Incuber pendant 5 minutes (± 1minute).

9.4.5. NE PAS RINCER.

9.5. Mélange d'anticorps primaires

9.5.1. Tapoter pour éliminer le réactif de blocage des protéines en excès.

9.5.2. Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.5.3. Appliquer 200 µl de mélange d'anticorps ProEx™ C (flacon 2) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.

9.5.4. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

9.5.5. Rincer chaque lame individuellement dans le TBST à l'aide d'un flacon pissette (ne pas diriger le jet directement sur la zone de dépôt des cellules). Charger les lames sur un portoir de lames.

9.5.6. Rincer les lames dans du TBST, à 3 reprises de 2 minutes chacune.

9.6. Chimie de détection

9.6.1. Tapoter pour éliminer le tampon en excès.

9.6.2. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.6.3. Appliquer 200 µl de réactif Sonde de souris (flacon 3a) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.

9.6.4. Incuber pendant 20 minutes (± 1 minute).

9.6.5. Rincer les lames dans du TBST, à 3 reprises de 2 minutes chacune.

9.6.6. Tapoter pour éliminer le tampon en excès.

9.6.7. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.6.8. Appliquer 200 µl de réactif Polymère (flacon 3b) pour couvrir la zone de dépôt des cellules.

9.6.9. Incuber pendant 20 minutes (± 1 minute).

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.6.10. Rincer les lames dans un bain de TBST, à 3 reprises de 2 minutes chacune.

9.6.11. Tapoter pour éliminer le tampon en excès.

9.6.12. Charger les lames dans la chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.6.13. Appliquer 200 µl de solution substrat-chromogène (DAB) pour couvrir complètement la zone de dépôt des cellules.

9.6.14. Incuber pendant 5 minutes (± 1 minute).

9.6.15. Rincer les lames pendant 5 minutes dans l'H_2O désionisée.

9.7. Coloration de contraste

9.7.1. Rincer les lames dans du TBST, pendant 2 minutes.

9.7.2. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.7.3. Appliquer 200 µl d'hématoxyline, le colorant de contraste (flacon 5) pour couvrir complètement la zone de dépôt des cellules.

9.7.4. Incuber pendant 1 minute (± 10 secondes).

9.7.5. Rincer les lames pendant 3 minutes sous l'H_2O courante.

9.7.6. Charger les lames dans une chambre humide préparée (remplie de serviettes en papier ou de tampons de gaze imprégnés d'eau).

9.7.7. Bleuir les lames en appliquant 200 µl d'agent bleuissant (flacon 6) pendant 1 minute (± 10 secondes).

9.7.8. Répéter le rinçage à l'eau courante pendant 1 minute.

9.8. Montage

9.8.1. Immerger les lames dans de l'éthanol 95 % pendant 1 minute, ou à 25 reprises.

9.8.2. Immerger les lames dans l'alcool absolu à 4 reprises de 1 minute, ou 25 fois, chacune.

9.8.3. Nettoyer avec du xylène, à 3 reprises de 1 minute, ou 25 fois, chacune.

9.8.4. Recouvrir les lames d'une lamelle avec un milieu de montage non aqueux.

10. STABILITÉ

10.1. Quand ils sont conservés à la température recommandée, les flacons de réactifs non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

10.2. Une fois ouverts, les réactifs sont stables pendant trente jours s'ils sont conservés à la température recommandée.

11. CONTRÔLE QUALITÉ

11.1. La variabilité des résultats provient souvent de différences de manipulations des échantillons qui s'écartent des procédures de test recommandées. Pour plus d'informations, consulter les directives de contrôle qualité du *Clinical and Laboratory Standards Institute*, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*.

11.2. Les cellules de contrôle SureDetect™ SiHa sont disponibles en tant que contrôle positif auprès de TriPath Imaging, Inc. Chaque flacon contient une lignée cellulaire de cancer cervical, qui est traité de la même manière que les échantillons cliniques. Un contrôle négatif universel constitué d'IgG de souris peut être utilisé en tant que contrôle négatif. Une lame de contrôle positive et négative doit être incluse dans toutes les procédures de coloration. Les résultats de la coloration doivent être utilisés en tant qu'indication de la validité de la procédure de coloration.

12. INTERPRÉTATION DE LA COLORATION

12.1. Échantillons de patient et de contrôle : Un cytologiste ou un pathologiste doit évaluer les lames colorées à l'aide d'un microscope optique. Les cellules peuvent être examinées manuellement ou conservées dans une galerie d'images électroniques provenant d'un microscope optique.

12.2. Lames de contrôle : Les lames de contrôle positive et négative doivent être examinées avant les échantillons de patient pour s'assurer que tous les réactifs ont fonctionné correctement. La présence d'un produit de réaction marron (tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine, DAB) dans les noyaux des lames de cellules de contrôle SiHa colorées avec le test SurePath® avec ProEx™ C est indicative d'une réactivité positive. La lame de contrôle négatif universel constitué d'IgG de souris colorée avec le test SurePath® avec ProEx™ C ne doit pas présenter de noyaux colorés en marron et ne doit présenter comme coloration que celle provenant de la coloration de contraste par l'hématoxyline.

12.3. Score des lames à l'aide d'un processus en 4 étapes.

Étape 1 : L'échantillon est-il adéquat ?
Le Système Bethesda (TBS) de rapport cytologique cervical (2nd Ed.) précise, « Une préparation liquide adéquate doit présenter un minimum d'au moins 5000 cellules épithéliales pavimenteuses bien visualisées/bien conservées. » Le même critère doit s'appliquer aux lames SurePath® avec ProEx™ C. Cependant, comme dans le cas des préparations Pap de routine, tout échantillon présentant des cellules anormales, c'est-à-dire qui montre une réaction moléculaire positive, est par définition satisfaisant pour l'évaluation. Si la réponse lors de cette étape est « oui », passer à l'étape suivante, si la réponse est « non », le résultat est ***Non satisfaisant pour l'évaluation***.

Étape 2 : Est-ce qu'il existe une coloration nucléaire marron modérée à intense dans les cellules épithéliales.
Pour répondre « oui » à cette étape, rechercher une coloration marron facilement observée. Si la coloration marron n'est présente qu'à l'état de trace ou « d'ombre », cela n'est pas suffisant pour rendre un résultat positif. Si aucune coloration nucléaire marron n'est observée, le résultat du test est ***Négatif.*** Si une coloration marron adéquate est observée, passer à l'étape suivante.

Étape 3 : Est-ce que la cellule qui présente une coloration nucléaire marron est une cellule épithéliale pavimenteuse ou une cellule glandulaire ?
Si la réponse est « oui », passer à l'étape suivante. Si la réponse est « non », le résultat du test est ***Négatif.***

Étape 4 : Est-ce que la cellule ≥ ASC (cellule épithéliale pavimenteuse atypique) ou AGC (cellule glandulaire atypique) ?
Utiliser les mêmes critères morphologiques que ceux du Système Bethesda (TBS) de rapport cytologique cervical (2nd Ed.) pour déterminer si la cellule épithéliale pavimenteuse contenant le noyau marron est ≥ ASC (cellule épithéliale pavimenteuse atypique). Si la cellule est considérée comme ≥ ASC (ou ≥ AGC), le résultat du test est alors ***Positif***. Ceci inclut les cellules ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, et les cas de cancer. Si la cellule est d'apparence glandulaire, les critères du TBS permettant de déterminer qu'une cellule est ≥ AGC (cellule glandulaire atypique) s'appliquent. Ceci inclut les cellules AGC endocervicales, AGC endométriales, AIS et les adénocarcinomes. Si la cellule en question est cohérente avec le NILM (négative pour les lésions intra-épithéliales ou les atteintes malignes) le résultat du test est ***Négatif***.

13. RÉFÉRENCES

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. GLOSSAIRE DES SYMBOLES

REF	Numéro de référence
IVD	Utilisation diagnostique *in vitro*
	Consulter les instructions d'utilisation
Σ	Contient 75 tests
	Attention, consulter les documents joints
	Limites de la température de conservation
LOT	Code du lot
	Utiliser avant AAAA-MM-JJ ou AAAA-MM
	Fabricant

ASSISTANCE TECHNIQUE
États-Unis
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Développé avec la technologie de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ sont des marques commerciales de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Réactifs de détection fournis par

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® est un produit et une marque commerciale de TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate sont des produits et des marques commerciales de TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. USO PREVISTO

La prueba inmunocitoquímica SurePath® con ProEx™ C está indicada para la evaluación cualitativa de las inducciones aberrantes de la fase S en las muestras citológicas cervicales recogidas en el líquido conservante SurePath®. Los resultados de la prueba proporcionan información complementaria para el diagnóstico citológico cervical.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) desempeñan un papel esencial en la replicación del ADN eucariótico. Cada una de las proteínas MCM tiene secuencias de ATPasa dependientes del ADN en su dominio central altamente conservado. Los niveles de proteínas MCM aumentan generalmente de una forma variable a medida que las células normales progresan de la fase G0 a la fase G1/S del ciclo celular. La topoisomerasa II alfa (TOP2A) es una enzima nuclear esencial utilizada en la replicación del ADN y es un objetivo para muchos medicamentos que se utilizan en la terapia contra el cáncer. La expresión disminuida de TOP2A es un mecanismo predominante de resistencia a varios agentes quimioterapéuticos. Se ha observado una variación significativa en el intervalo de expresión de esta proteína en muchos tumores diferentes. La TOP2A es predominante en células en proliferación y se modifica en la fase M por fosforilación en puntos específicos, lo que es de vital importancia para la condensación y segregación de cromosomas mitóticos.

El cóctel de anticuerpos ProEx™ C contiene anticuerpos monoclonales de ratón anti-MCM2 y anti-TOP2A purificados a partir de sobrenadante de cultivo tisular y diluidos en una solución salina tamponada que contiene estabilizadores proteicos y azida de sodio al 0,09%.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El kit de pruebas inmunocitoquímicas SurePath® con ProEx™ C contiene un cóctel de anticuerpos, los reactivos de detección y contratinción necesarios para la realización de un procedimiento de tinción inmunocitoquímica automático o manual de tres pasos de muestras del cuello uterino de capa fina preparadas de forma rutinaria. Después de la incubación de la muestra con un cóctel de anticuerpos de ratón propio, se visualiza la unión a anticuerpos monoclonales selectivos, indicativa de una prueba positiva, mediante un sistema cromogénico de anticuerpos unidos a enzimas único listo para su uso. El reactivo enzimático es un anticuerpo de chivo anti-ratón secundario, conjugado con peroxidasa de rábano, unido a una espina dorsal de polímero de dextrano. La adición de un cromógeno específico produce la formación de un producto cromogénico visible localizado en los puntos de unión de antígenos y anticuerpos. A continuación, se realiza la contratinción de la muestra con hematoxilina, se aplica un agente de coloración azul y se cubre el portaobjetos. Los resultados se interpretan mediante un microscopio óptico. Se consigue un resultado positivo, indicativo de un alto grado de enfermedad cervical, cuando el núcleo de las células de interés se tiñe de marrón.

Se puede crear una galería de referencia de portaobjetos potencialmente positivos utilizando un equipo de formación de imágenes automático. A continuación, se puede analizar la galería para determinar si el resultado es positivo o negativo.

La prueba inmunocitoquímica SurePath® con ProEx™ C se puede utilizar tanto con tinción manual como automática.

4. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Se incluyen los siguientes materiales, que son suficientes para 75 preparaciones de capa fina:

Nº de vial	Descripción	🌡
1a	**Inhibidor de peroxidasa:** Peróxido de hidrógeno tamponado más estabilizador y componentes propios	2 a 8 ºC
1b	**Inhibidor de proteínas:** Caseína purificada más combinación propia de proteínas en solución PBS modificada con conservante y surfactante	2 a 8 ºC
2	**Cóctel de anticuerpos:** Cóctel de anticuerpos monoclonales listo para usar suministrado en solución tamponada de TRIS con Tween 20, pH 7,4. Contiene proteínas estabilizantes y un agente antimicrobiano	2 a 8 ºC
3a	**Sonda de ratón:** Se une a los anticuerpos monoclonales de ratón	2 a 8 ºC
3b	**Reactivo polimérico:** Polímero conjugado con peroxidasa de rábano que se une al reactivo sonda de ratón	2 a 8 ºC
4a	**Sustrato de tampón DAB:** Tampón sustrato utilizado en la preparación del cromógeno DAB	2 a 8 ºC
4b	**DAB:** 3,3'-solución cromogénica de 3,3'-diaminobencidina.	2 a 8 ºC
5	**Hematoxilina:** Hematoxilina de Mayer acuosa	15 a 30 ºC
6	**Agente de coloración azul:** Solución salina tamponada de Tris, pH 7,4 con Tween 20 y NaN_3 al 0,09%	15 a 30 ºC

5. MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Toallitas absorbentes
- Línea celular SiHa SureDetect™ – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Agua desionizada o destilada
- Etanol (95% y 100%)
- Tapas de vidrio
- Guantes
- Cámara húmeda
- Microscopio óptico (objetivos 10x, 20x (opcional), 40x)
- Medios de montaje
- Pipetas y puntas de pipetas (capaces de suministrar volúmenes de 20µL, 200µL y 1000µL)
- Tampón de preparación de portaobjetos SureDetect™ 10X – REF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Tampón de tratamiento previo
- Jarras o baños de tinción
- Reloj (con capacidad para intervalos de 1-60 minutos)
- Solución salina tamponada de Tris (TBS)
- Tween 20
- Control negativo universal de IgG de ratón
- Agitador vórtex
- Xileno o sustitutos de xileno
- Vaporera/baño de agua

6. ADVERTENCIAS

Xn - Nocivo	Hidrato de cloral ***Frases de riesgo:*** *22 Nocivo si se ingiere.* ***Frases de seguridad:*** *23 No inhalar gases, humos, vapores o pulverizaciones.* *25 Evitar el contacto con la piel y los ojos.* *36 Llevar ropa de protección adecuada.* *45 En caso de accidente o si no se encuentra bien, acuda al médico inmediatamente.* *60 Este material y su recipiente deberán desecharse como residuos peligrosos.*
Xn - Nocivo	3,3 diaminobencidina ***Frases de riesgo:*** *22 Nocivo si se ingiere.* *40 Pruebas limitadas de un efecto carcinógeno.* ***Frases de seguridad:*** *23 No inhalar gases, humos, vapores o pulverizaciones.* *36/37 Llevar ropa y guantes de protección adecuados.* *60 Este material y su recipiente deberán desecharse como residuos peligrosos*

7. PRECAUCIONES

7.1. Para uso diagnóstico *in vitro*.

7.2. Los portaobjetos SurePath® preparados se deben colocar en el tampón de tratamiento previo tan pronto como estén preparados. Los portaobjetos deben permanecer en el tampón de tratamiento previo durante al menos 1 hora, pero no más de 72 horas antes de la inmunocitoquímica.

7.3. No deje que los portaobjetos se sequen durante ningún momento del procedimiento. Los portaobjetos que se hayan secado durante el procedimiento podrían hacer aumentar el ruido de fondo.

7.4. La 3,3'-diaminobencidina (DAB) está clasificada como una sustancia sospechada de ser cancerígena con el posible riesgo de producir efectos irreversibles. Evite el contacto físico y la exposición prolongada o repetida a esta sustancia. Se recomienda utilizar una campana extractora química. Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. Lávese bien las manos tras la manipulación. La solución de trabajo DAB se debe preparar de acuerdo con el folleto de la caja.

7.5. Algunos reactivos en este kit contienen azida de sodio (NaN_3), un producto químico altamente tóxico en estado puro. La azida de sodio puede ser mortal si se ingiere o es absorbida a través de la piel. Estos reactivos son nocivos si se inhalan. Estos reactivos son sólidos peligrosos. Causa irritación en la piel, ojos y las vías respiratorias. Afecta al sistema nervioso central, a los riñones y al sistema cardiovascular. Aunque no estén clasificados como peligrosos a las concentraciones del producto, las acumulaciones de azida de sodio pueden reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas de metal altamente explosivas. Después de desecharla, lave con grandes volúmenes de agua para evitar la acumulación de azida en las tuberías.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.6. Hematoxilina y agente de coloración azul: Estos reactivos son nocivos si se ingieren. La hematoxilina y los agentes de coloración azul causan irritación en los ojos, la piel y las vías respiratorias.

7.7. Las muestras y todos los materiales que se expongan a ellas se deben tratar como si tuvieran la capacidad de transmitir infecciones y se deben desechar con las precauciones adecuadas. Nunca abra las pipetas de los reactivos con la boca y evite el contacto de los reactivos y muestras con la piel y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con abundante agua.

7.8. Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos para evitar tinciones no específicas.

7.9. Cualquier tiempo, temperatura o método de incubación que no sean los especificados puede producir resultados erróneos.

7.10. Los reactivos se han diluido para un rendimiento óptimo. Una mayor dilución podría resultar en la pérdida de la tinción del antígeno.

7.11. Los componentes del kit son específicos a cada lote. No sustituya los componentes del kit con componentes pertenecientes a otros lotes de fabricación. Los números de lote aparecen en las etiquetas del envase.

7.12. No utilice el kit de pruebas SurePath® con ProEx™ C después de la fecha de caducidad impresa en la caja. El usuario debe revisar las condiciones de almacenamiento de los reactivos si éstas no son las que se especifican en el folleto de la caja.

7.13. No hay signos obvios que indiquen la degradación de este producto. Por lo tanto, se deben llevar a cabo controles negativos y positivos de forma simultánea con las muestras de las pacientes. Si se observa una tinción inesperada, que no se puede explicar por variaciones en los procedimientos de laboratorio o se sospecha de un problema con el kit de pruebas SurePath® con ProEx™ C, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de TriPath Imaging.

7.14. Lleve el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto de los reactivos con los ojos y la piel. Consulte las hojas de datos de seguridad de materiales (MSDS) para obtener información adicional.

7.15. La prueba SurePath® con ProEx™ C está indicada para su uso con muestras de citología cervical recogidas en líquido conservante SurePath®. La compatibilidad con preparaciones de monocapa y convencionales distintas SurePath® no se han evaluado.

8. INSTRUCCIONES DE USO

8.1. Preparación de la muestra

8.1.1. Consulte en el Manual del operario de SurePath® PrepStain System las instrucciones para la preparación de portaobjetos a partir de muestras citológicas cervicales SurePath® residuales.

8.1.2. Añada 8 mL de líquido conservante SurePath® a la muestra residual en el vial SurePath® (2 mL aproximadamente). La muestra diluida se debe procesar en BD PrepMate™ mediante la técnica estándar y en PrepStain.

8.1.3. Los portaobjetos SurePath® preparados se deben colocar en un tampón de preparación de portaobjetos SureDetect™ tan pronto como estén preparados (consulte en el Tampón de preparación de portaobjetos SureDetect™ 10X las indicaciones para la preparación de una solución de portaobjetos de trabajo). Los portaobjetos deben permanecer en el tampón durante al menos 1 hora, pero no más de 72 horas antes de la inmunocitoquímica.

8.1.4. Se debe utilizar un procedimiento de recuperación de epitopos para un rendimiento óptimo del kit. Este procedimiento implica poner en remojo los portaobjetos preparados en una solución de trabajo de tampón de preparación de portaobjetos SureDetect™ durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente seguido del calentamiento de los portaobjetos en el tampón de tratamiento previo a 95 ºC. Los portaobjetos deben mantenerse a 95 ºC durante 15 minutos y dejarse enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recomienda el uso de un baño de agua calibrado o de una vaporera de verduras que pueda mantener la temperatura necesaria. Los laboratorios ubicados en alturas superiores deben determinar el mejor método para mantener la temperatura necesaria. El procedimiento de tinción se debe iniciar inmediatamente después de la recuperación de epitopos y del enfriamiento. Las desviaciones del procedimiento descrito podrían afectar de forma adversa a los resultados.

8.2. Preparación del reactivo

8.2.1. Prepare los siguientes reactivos antes de la tinción.

8.2.2. Solución salina tamponada de Tris con Tween 20 al 0,05% (TBST)

8.2.2.1. Prepare la solución TBS de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

8.2.2.2. Si aún no está presente en la solución TBS, añada Tween 20 a una concentración final de 0,05%.

8.2.3. Solución sustrato-cromógeno (DAB) (volumen suficiente para 5 portaobjetos)

8.2.3.1. Transfiera 1 mL de tampón sustrato DAB (vial 4a) a un tubo de ensayo.

8.2.3.2. Añada una gota (de 20 a 30µL) de cromógeno DAB (vial 4b). Mézclelo bien y aplíquelo a los portaobjetos con una pipeta.

8.2.3.3. Prepare la solución sustrato-cromógeno a diario.

8.2.3.4. La calidad de la tinción no se ve afectada por el precipitado que se puede producir en la solución.

9. PROTOCOLO DE TINCIÓN (realizado a temperatura ambiente, de 20 a 25 ºC)

9.1. Notas acerca del procedimiento de tinción

9.1.1. Lea todas las instrucciones atentamente y familiarícese con todos los componentes antes de utilizarlos (consulte la sección Precauciones).

9.1.2. Hay que equilibrar todos los reactivos a la temperatura ambiente (20-25 ºC) antes de la inmunotinción.

9.1.3. Todas las incubaciones se deben realizar a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario.

9.1.4. No deje que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de tinción. Las preparaciones celulares secas pueden producir un aumento de la tinción no específica. Proteja los portaobjetos que puedan estar expuestos a corrientes de aire. Hay que colocar los portaobjetos en una cámara húmeda durante incubaciones prolongadas.

9.2. Recuperación de epitopos

9.2.1. Coloque los portaobjetos preparados en una jarra de Coplin que contenga una solución de trabajo de tampón de preparación de portaobjetos SureDetect™ durante un mínimo de 1 hora hasta un máximo de 72 horas.

9.2.2. Incúbelos en un baño de agua o una vaporera durante 15 minutos a 95 ºC.

9.2.3. Retire toda la jarra de Coplin con los portaobjetos del baño de agua o la vaporera y deje que se enfríen en el tampón durante 20 minutos.

9.2.4. Enjuague los portaobjetos con H_2O desionizada y transfiéralos a una jarra de Coplin limpia que contenga TBST.

9.3. Reactivo inhibidor

9.3.1. Golpee suavemente varias veces para eliminar el tampón sobrante.

9.3.2. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.3.3. Aplique 200 µL de reactivo inhibidor de peroxidasa (vial 1a) para cubrir el área de deposición del pocillo.

9.3.4. Incúbelo durante 5 minutos (±1 minuto).

9.3.5. Enjuague los portaobjetos en TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.

9.4. Inhibidor de proteínas

9.4.1. Golpee suavemente varias veces para eliminar el tampón sobrante.

9.4.2. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.4.3. Aplique 200 µL de inhibidor de proteínas (vial 1a) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.

9.4.4. Incúbelo durante 5 minutos (±1 minuto).

9.4.5. NO LO ENJUAGUE.

9.5. Cóctel de anticuerpos principales

9.5.1. Golpee suavemente varias veces para eliminar el inhibidor de proteínas sobrante.

9.5.2. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.5.3. Aplique 200 µL de cóctel de anticuerpos C ProEx™ (vial 2) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.

9.5.4. Incúbelos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

9.5.5. Enjuague cada portaobjetos de forma individual con TBST utilizando una botella de lavado (no dirija el flujo directamente al área de deposición del pocillo). Cargue los portaobjetos en una gradilla.

9.5.6. Enjuague los portaobjetos en TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.

9.6. Química de detección

9.6.1. Golpee suavemente varias veces para eliminar el tampón sobrante.

9.6.2. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.6.3. Aplique 200 µL de reactivo sonda de ratón (vial 3a) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.

9.6.4. Incúbelo durante 20 minutos (±1 minuto).

9.6.5. Enjuague los portaobjetos en TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.

9.6.6. Golpee suavemente varias veces para eliminar el tampón sobrante.

9.6.7. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.6.8. Aplique 200 µL de reactivo polimérico (vial 3b) para cubrir el área de deposición del pocillo.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.6.9. Incúbelo durante 20 minutos (±1 minuto).

9.6.10. Enjuague los portaobjetos en un baño de TBST, con 3 cambios, de 2 minutos cada uno.

9.6.11. Golpee suavemente varias veces para eliminar el tampón sobrante.

9.6.12. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.6.13. Aplique 200 µL de solución sustrato-cromógeno (DAB) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.

9.6.14. Incúbelo durante 5 minutos (±1 minuto).

9.6.15. Enjuague los portaobjetos durante 5 minutos en H_2O desionizada.

9.7. Contratinción

9.7.1. Enjuague los portaobjetos en TBST, con 1 cambio, de 2 minutos cada uno.

9.7.2. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.7.3. Aplique 200 µL de colorante de contraste hematoxilina (vial 5) para cubrir completamente el área de deposición del pocillo.

9.7.4. Incúbelo durante 1 minuto (±10 segundos).

9.7.5. Enjuague los portaobjetos durante 3 minutos en H_2O corriente.

9.7.6. Cargue los portaobjetos en una cámara de humedad preparada (llena de toallas de papel o gasas humedecidas en agua).

9.7.7. Tiña los portaobjetos de azul mediante la aplicación de 200 µL de agente de coloración azul (vial 6) durante un minuto (±10 segundos).

9.7.8. Repita el enjuague con agua corriente durante 1 minuto.

9.8. Montaje

9.8.1. Sumerja los portaobjetos en 95% de etanol durante 1 minuto o realice 25 inmersiones.

9.8.2. Sumerja los portaobjetos en alcohol absoluto, con 4 cambios, durante 1 minuto cada uno, o realice 25 inmersiones.

9.8.3. Limpie con xileno, con 3 cambios, durante 1 minuto cada uno o realice 25 inmersiones.

9.8.4. Cubra los portaobjetos con medios de montaje permanentes no acuosos utilizando tapas de vidrio.

10. ESTABILIDAD

10.1. Si se almacenan a las temperaturas recomendadas, los viales de los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad que se indica en el vial.

10.2. Una vez abiertos, los reactivos son estables durante treinta días si se almacenan a las temperaturas recomendadas.

11. CONTROL DE CALIDAD

11.1. Las variaciones en los resultados se suelen deber a diferencias en el tratamiento de las muestras con respecto a los procedimientos de prueba recomendados. Para obtener información adicional, consulte las directrices de control de calidad *Quality Assurance for Immunocytochemistry* del Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio).

11.2. El control celular SureDetect™ está disponible como control positivo a través de TriPath Imaging, Inc. Cada vial contiene una línea celular de cáncer cervical que se procesa de forma similar a las muestras clínicas. Se puede utilizar un control negativo universal de IgG de ratón como control negativo. Se debe incluir un portaobjetos de control negativo y positivo en cada procedimiento de tinción. Los resultados de tinción se deben utilizar como una indicación de la validez del proceso de la tinción.

12. INTERPRETACIÓN DE LA TINCIÓN

12.1. Muestras de control y de la paciente: Los portaobjetos con tinción deberán ser evaluados por un citotécnico o un patólogo con un microscopio óptico. Las células se pueden analizar de forma manual o se pueden almacenar en una galería de imágenes electrónica procedente del microscopio óptico.

12.2. Portaobjetos de control: Los portaobjetos de control negativo y positivo se deben examinar antes de revisar las muestras de la paciente para determinar que todos los reactivos han funcionado correctamente. La presencia de un producto de reacción marrón (3,3'-diaminobencidina tetraclorhidrato, DAB) en los núcleos del portaobjetos de control de células SiHa teñido con la prueba SurePath® con ProEx™ C es indicativo de una reactividad positiva. El control negativo universal de IgG de ratón teñido con la prueba SurePath® con ProEx™ C no debe tener núcleos de tinción marrones y debe mostrar tinción sólo a partir del colorante de contraste hematoxilina.

12.3. La puntuación de los portaobjetos es un proceso de 4 pasos.

Paso 1: ¿Es adecuada la muestra?
El Sistema Bethesda (TBS) de información de citología cervical (2.ª edición) establece lo siguiente: "Una preparación adecuada basada en líquidos debe tener un mínimo estimado de al menos 5000 células escamosas debidamente conservadas y visualizadas". Los mismos criterios se deben aplicar a los portaobjetos SurePath® con ProEx™ C. Sin embargo, al igual que con la preparación de Papanicolaou rutinaria, cualquier muestra con células anómalas que presentan una reacción molecular positiva, es, por definición, satisfactoria para su evaluación. Si la respuesta a este paso es "sí", continúe con el siguiente paso; si la respuesta es "no", el resultado es ***No satisfactorio para la evaluación.***

Paso 2: ¿Existe tinción marrón de intensa a moderada en las células epiteliales?
Para contestar "sí" a este paso, busque tinción marrón que se vea fácilmente. Si sólo se ve una cantidad apenas perceptible o de tono rosáceo, no es suficiente para garantizar una interpretación positiva. Si no se ve ninguna tinción nuclear marrón, el resultado se notifica como ***Negativo***. Si se visualiza una tinción marrón adecuada, continúe con el siguiente paso.

Paso 3: ¿Es la célula con tinción marrón nuclear una célula glandular o escamosa? Si la respuesta es sí, continúe con el siguiente paso. Si la respuesta es no, el resultado de la prueba es ***Negativo***.

Paso 4: ¿Es la célula ≥ ASC (célula escamosa atípica) o AGC (célula glandular atípica)?
Utilice los mismos criterios morfológicos descritos en el Sistema Bethesda de información de citología cervical (2.ª edición) para determinar si la célula escamosa que contiene el núcleo marrón es ≥ ASC (células escamosas atípicas). Si la célula se considera ≥ASC (o ≥AGC), el resultado de la prueba es ***Positivo***. Esto incluye ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL y cáncer. Si la célula tiene un aspecto glandular, se aplican los criterios TBS para determinar si una célula es ≥ AGC (células glandulares atípicas). Esto incluye AGC endocervicales, AGC endometriales, AIS y adenocarcinoma. Si la célula en cuestión concuerda con NILM (negativo para lesión intraepitelial o tumor maligno), el resultado de la prueba es ***Negativo***.

13. REFERENCIAS

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. (El sistema Bethesda para informar la citología cervical. Definiciones, criterios y notas aclaratorias). 2.ª edición. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. GLOSARIO DE SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo
IVD	Para uso diagnóstico *in vitro*
	Consultar instrucciones de uso
Σ	Contiene 75 pruebas
	Atención: consultar documentación incluida
	Límites de temperatura de almacenamiento
LOT	Código de lote
	Utilizar antes de AAAA-MM-DD o AAAA-MM
	Fabricante

SERVICIO DE ASISTENCIA TÉCNICA
EE. UU.
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Desarrollado con tecnología de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

y MILLENNIUM™ son marcas comerciales de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 EE.UU.
www.millennium.com

Reactivos de detección suministrados por:

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® es un producto y una marca registrada de TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain y PrepMate son productos y marcas comerciales de TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx™ C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. USO PREVISTO

Il test immunocitochimico SurePath® con ProEx™ C è previsto per la valutazione qualitativa dell'induzione della fase S aberrante in campioni citologici cervicali raccolti nel conservante SurePath®. I risultati del test forniscono informazioni addizionali per la diagnosi citologica cervicale.

2. RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Le proteine di mantenimento del minicromosoma (MCM) rivestono un ruolo importante nella replicazione del DNA eucariotico. Ciascuna proteina MCM presenta, nel proprio dominio centrale altamente conservativo, sequenze di ATPasi DNA dipendente. I livelli di proteine MCM generalmente aumentano in modo variabile quando le cellule normali progrediscono dalla fase G0 alla fase G1/S del ciclo cellulare. La topoisomerasi II alpha (TOP2A) è un enzima nucleare strutturale coinvolto nella replicazione del DNA e rappresenta il bersaglio di numerosi farmaci utilizzati nelle terapie anti-cancro. La diminuzione di espressione di TOP2A indica l'induzione di un meccanismo di resistenza a numerosi agenti chemioterapici. Una variazione significativa nella gamma di espressione di questa proteina è stata osservata in diversi tumori. La TOP2A è espressa essenzialmente nelle cellule proliferanti e viene modificata nella fase M tramite fosforilazione di siti specifici, importante per la condensazione e la segregazione dei cromosomi mitotici.

Il cocktail di anticorpi ProEx™ C contiene anti-MCM2 e anti-TOP2A monoclonali di topo purificati da sovranatante di coltura tissutale e diluiti in soluzione salina tamponata contenente stabilizzanti delle proteine e sodio azide allo 0,09 %.

3. PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il kit per test immunocitochimico SurePath® con ProEx™ C contiene un cocktail di anticorpi, reagenti di rilevazione e colorazione di contrasto necessari per l'esecuzione di una procedura di colorazione immunocitochimica a tre fasi, manuale o automatica, di campioni cervicali di routine allestiti con la tecnica dello strato sottile. Dopo l'incubazione del campione con un cocktail proprietario di anticorpi di topo, il legame specifico dell'anticorpo monoclonale, che indica un test positivo, viene visualizzato tramite un sistema di anticorpi coniugati ad un enzima ed un cromogeno, pronto all'uso. Il reagente enzimatico è un anticorpo secondario, anti-topo da capra, coniugato con perossidasi estratta da radice di rafano, legato ad una catena primaria di destrano. L'aggiunta di uno specifico cromogeno provoca la formazione di un precipitato colorato visibile, localizzato in corrispondenza dei siti di legame antigene-anticorpo. Il campione viene sottoposto a colorazione di contrasto con ematossilina, viene applicato un agente di colorazione blu e su di esso viene montato il vetrino coprioggetti. I risultati vengono interpretati tramite microscopio ottico. Il risultato positivo, indice di patologia cervicale di alto grado, si ottiene quando il nucleo delle cellule in questione si colora di marrone.

È possibile creare una galleria di riferimento di vetrini potenzialmente positivi utilizzando apparecchiature di imaging automatiche. È quindi possibile consultare la galleria per determinare un risultato positivo o negativo.

Il test immunocitochimico SurePath® con ProEx™ C è applicabile a procedure di colorazione sia manuali che automatiche.

4. REAGENTI FORNITI

Vengono forniti i seguenti materiali, sufficienti per 75 preparazioni a strato sottile:

Fiala nr.	Descrizione	
1°	**Bloccante della perossidasi:** perossido di idrogeno tamponato, più stabilizzatore e componenti proprietari	2-8 °C
1b	**Blocco proteina:** caseina purificata più una combinazione proprietaria di proteine in PBS modificata con conservante e tensioattivo	2-8 °C
2	**Cocktail di anticorpi:** cocktail di anticorpi monoclonali pronto all'uso fornito in soluzione tamponata TRIS con Tween 20, pH 7,4. Contiene proteine stabilizzanti e agente anti-microbico.	2-8 °C
3°	**Reagente probe per topo:** si lega agli anticorpi monoclonali di topo	2-8 °C
3b	**Reagente polimero:** polimero coniugato con perossidasi di rafano che si lega al reagente probe per topo	2-8 °C
4°	**Substrato tamponato DAB:** substrato tamponato usato per la preparazione del cromogeno DAB	2-8 °C
4b	**DAB:** soluzione cromogeno 3,3'-diaminobenzidina	2-8 °C
5	**Ematossilina:** ematossilina di Mayer su base acquosa	15-30 °C
6	**Agente di colorazione blu:** soluzione salina tamponata Tris, pH 7,4 con Tween 20 e 0,09% NaN_3	15-30 °C

5. MATERIALI E REAGENTI NECESSARI MA NON FORNITI

- Carta assorbente
- SureDetect™ SiHa Cell Control – RIF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Linea cellulare di controllo
- Acqua deionizzata o distillata
- Etanolo (95 % e 100 %)
- Vetrini coprioggetti
- Guanti
- Camera umida
- Microscopio ottico [obiettivi 10x, 20x (opzionale), 40x]
- Mezzo di montaggio
- Pipette e puntali (in grado di erogare volumi da 20µl, 200µl e 1000µl)
- SureDetect™ Slide Preparation Buffer 10X – REF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Tampone di pretrattamento
- Vaschette o bagni di colorazione
- Timer (con intervalli di 1-60 minuti)
- Soluzione tamponata di Tris (TBS)
- Tween 20
- Controllo negativo universale per IgG di topo
- Vortexer
- Xilene o sostitutivi dello xilene
- Pentola elettrica per cottura a vapore delle verdure/bagnomaria

6. AVVERTENZE

Xn - Nocivo	Idrato di cloro ***Frasi di rischio:*** *22 Nocivo se ingerito.* ***Frasi di sicurezza:*** *23 Non respirare gas/esalazioni/vapori/aerosol.* *25 Evitare il contatto con gli occhi.* *36 Indossare indumenti protettivi adeguati.* *45 In caso di incidente o di malessere, consultare immediatamente un medico.* *60 Questo materiale e il recipiente devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.*
Xn - Nocivo	3,3 diaminobenzidine (DAB) ***Frasi di rischio:*** *22 Nocivo se ingerito.* *40 Possibilità di effetti cancerogeni - prove insufficienti.* ***Frasi di sicurezza:*** *23 Non respirare gas/esalazioni/vapori/aerosol.* *36/37 Indossare indumenti e guanti protettivi adatti.* *60 Questo materiale e il recipiente devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi*

7. PRECAUZIONI

7.1. Per uso diagnostico *in vitro*.

7.2. Appena pronti, i vetrini SurePath® devono essere posti nel tampone di pretrattamento, dove dovranno rimanere per almeno 1 ora, ma non più di 72 ore, prima del test immunocitochimico.

7.3. Evitare l'essiccazione dei vetrini in qualunque fase della procedura. I vetrini che abbiano subito essiccazione durante la preparazione possono presentare un aumento nella colorazione di fondo.

7.4. La 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) è classificata come sostanza a sospetta azione cancerogena, in grado di indurre potenziali effetti irreversibili. Evitare il contatto fisico ed esposizioni prolungate o ripetute. È vivamente consigliato l'uso del reagente all'interno di una cappa chimica. Evitare il contatto con occhi, cute o indumenti. Lavarsi le mani con cura dopo la manipolazione. La soluzione di lavoro DAB deve essere preparata conformemente a quanto indicato sul foglietto illustrativo.

7.5. Alcuni reagenti del kit contengono sodio azide (NaN_3), una sostanza chimica fortemente tossica in forma pura. Tale sostanza può avere effetti letali se ingerita o assorbita attraverso la cute. Questi reagenti sono nocivi se inalati. Essi sono pericolosi allo stato solido. Provocano irritazioni alla cute, agli occhi e al tratto respiratorio. Colpiscono il sistema nervoso centrale, i reni ed il sistema cardiovascolare. Sebbene questi reagenti, alle concentrazioni impiegate nel kit, non siano classificati come prodotti pericolosi, il contenuto di sodio azide alle concentrazioni indicate può reagire con il rame o il piombo delle tubature formando azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento, sciacquare con abbondante acqua in modo di prevenire l'eventuale formazione ed accumulo di azidi nelle tubature.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.6. Ematossilina e agente di colorazione blu: questi reagenti sono dannosi se ingeriti. L'ematossilina e gli agenti di colorazione blu sono irritanti per occhi, cute e tratto respiratorio.

7.7. I campioni e tutti i materiali che entrano in contatto con essi devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e pertanto devono essere smaltiti assumendo tutte le precauzioni necessarie. Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare che reagenti e campioni entrino in contatto con la pelle e le mucose. In caso di contatto dei reagenti con zone sensibili, lavare la zona con abbondante acqua.

7.8. Evitare la contaminazione batterica dei reagenti, altrimenti potrebbe verificarsi una colorazione aspecifica.

7.9. Tempi, temperature e modalità di incubazione diversi da quelli specificati possono generare risultati erronei.

7.10. I reagenti sono stati diluiti per assicurare una prestazione ottimale. Ulteriori diluizioni potrebbero causare la perdita di colorazione antigenica.

7.11. I componenti del kit sono lotto specifici. Non scambiare i componenti del kit con reagenti aventi altri numeri di lotto. I numeri di lotto appaiono sulle etichette della confezione.

7.12. Non utilizzare il kit SurePath® con ProEx™ C dopo la data di scadenza indicata sulla confezione. Nel caso in cui i reagenti vengano conservati in condizioni diverse da quelle specificate nel foglietto illustrativo, l'utente dovrà convalidarne lo stato.

7.13. Non esistono segni univoci che possano indicare il degrado del prodotto. Pertanto, i controlli positivi e negativi devono essere eseguiti contemporaneamente ai campioni del paziente. Se si osserva una colorazione imprevista, non derivante da variazioni nelle procedure di laboratorio, o si sospetta un problema nel kit per il test SurePath® con ProEx™ C, contattare l'assistenza tecnica TriPath Imaging.

7.14. Indossare idonei presidi di protezione personale, atti ad evitare il contatto dei reagenti con occhi e cute. Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza del materiale (MSDS).

7.15. Il test SurePath® con ProEx™ C è stato sviluppato per l'impiego su campioni citologici cervicali raccolti in conservante SurePath®. Non è stata valutata la compatibilità con strisci tradizionali e preparazioni a strato sottile diverse dalle SurePath®.

8. ISTRUZIONI PER L'USO

8.1. Preparazione dei campioni

8.1.1. Consultare il Manuale per l'operatore del SurePath® PrepStain System per istruzioni inerenti alla preparazione dei vetrini da campioni citologici cervicali residui SurePath®.

8.1.2. Aggiungere 8 mL di conservante SurePath® al campione residuo nel contenitore SurePath® (circa 2 mL). Il campione diluito deve essere elaborato su BD PrepMate™ secondo la tecnica standard e su PrepStain.

8.1.3. Appena allestiti, i vetrini SurePath® devono essere posti nel tampone di preparazione SureDetect™ (fare riferimento a Tampone di preparazione dei vetrini 10X SureDetect™ per istruzioni sulla preparazione della soluzione di lavoro). I vetrini devono rimanere nel tampone per almeno 1 ora, ma non più di 72 ore, prima del test immunocitochimico.

8.1.4. Per ottenere prestazioni ottimali dal kit, eseguire la procedura di smascheramento degli epitopi. Questa procedura prevede l'immersione dei vetrini allestiti nella soluzione tamponata SureDetect™ per almeno 1 ora a temperatura ambiente, e successivo riscaldamento dei vetrini nel tampone di pretrattamento a 95 °C. I vetrini vengono mantenuti a 95 °C per 15 minuti e lasciati raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. È consigliato l'uso di un bagnomaria adeguatamente calibrato o di una pentola elettrica per cottura a vapore delle verdure in grado di mantenere la temperatura richiesta. I laboratori situati ad altitudini particolarmente elevate devono determinare il metodo migliore per il mantenimento della temperatura richiesta. La procedura di colorazione deve essere avviata immediatamente dopo la procedura di smascheramento degli epitopi e il raffreddamento. La mancata osservanza della procedura descritta può influenzare negativamente i risultati.

8.2. Preparazione dei reagenti

8.2.1. Preparare i seguenti reagenti prima della colorazione.

8.2.2. Soluzione tamponata di Tris con 0,05 % Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. Preparare la soluzione di TBS secondo le specifiche del produttore.

8.2.2.2. Se non ancora presente nel TBS, aggiungere Tween 20 fino ad una concentrazione finale dello 0,05 %.

8.2.3. Soluzione substrato-cromogeno (DAB) (volume sufficiente per 5 vetrini)

8.2.3.1. Trasferire 1 mL di tampone substrato DAB (flacone 4a) in una provetta.

8.2.3.2. Aggiungere una goccia (20-30 µL) di cromogeno DAB (flacone 4b). Miscelare bene ed applicare sui vetrini tramite una pipetta.

8.2.3.3. Preparare quotidianamente la soluzione substrato-cromogeno.

8.2.3.4. La qualità di colorazione non viene condizionata dal precipitato che può svilupparsi nella soluzione.

9. PROTOCOLLO DI COLORAZIONE (eseguito a temperatura ambiente, 20-25 °C)

9.1. Note sulla procedura di colorazione

9.1.1. Leggere attentamente queste istruzioni ed acquisire familiarità con tutti i componenti prima dell'uso (vedere Precauzioni).

9.1.2. Tutti i reagenti devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'immunocolorazione.

9.1.3. Tutte le incubazioni devono essere eseguite a temperatura ambiente, se non diversamente specificato.

9.1.4. Evitare l'essiccamento dei vetrini durante la procedura di colorazione. Preparazioni cellulari essiccate possono presentare una maggiore colorazione aspecifica. Proteggere i vetrini che possano essere esposti a correnti d'aria. Per incubazioni prolungate, porre i vetrini in una camera umida.

9.2. Smascheramento degli epitopi

9.2.1. Porre i vetrini allestiti in una coplin jar contenente una soluzione di tampone per preparazione vetrini SureDetect™ diluita per almeno 1 ora, fino ad un massimo di 72 ore.

9.2.2. Incubare in un bagnomaria o in una pentola per cottura a vapore delle verdure per 15 minuti a 95 °C.

9.2.3. Rimuovere la coplin jar contenente i vetrini dal bagnomaria o dalla pentola e lasciare raffreddare i vetrini nel tampone per 20 minuti.

9.2.4. Sciacquare i vetrini con acqua deionizzata e trasferire in una coplin jar pulita contenente TBST.

9.3. Reagente bloccante

9.3.1. Scuotere il vetrino per eliminare il tampone in eccesso.

9.3.2. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.3.3. Applicare 200 µL di reagente bloccante la perossidasi (flacone 1a) coprendo l'area di deposito delle cellule.

9.3.4. Incubare per 5 minuti (±1 minuto).

9.3.5. Sciacquare i vetrini in TBST, 3 cambi, 2 minuti ciascuno.

9.4. Blocco proteico

9.4.1. Scuotere il vetrino per eliminare il tampone in eccesso.

9.4.2. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.4.3. Applicare 200 µL di bloccante proteico (flacone 1b) coprendo completamente l'area di deposito delle cellule.

9.4.4. Incubare per 5 minuti (±1 minuto).

9.4.5. NON SCIACQUARE.

9.5. Cocktail di anticorpi primarii

9.5.1. Scuotere il vetrino per eliminare il bloccante delle proteine in eccesso.

9.5.2. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.5.3. Applicare 200 µL di Cocktail Ab ProEx™ C (flacone 2) coprendo completamente l'area di deposito delle cellule.

9.5.4. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.

9.5.5. Sciacquare ciascun vetrino singolarmente con TBST usando una spruzzetta (non indirizzare il flusso direttamente sull'area di deposito delle cellule). Caricare i vetrini in un rack porta-vetrini.

9.5.6. Sciacquare i vetrini in TBST, 3 cambi, 2 minuti ciascuno.

9.6. Soluzioni di rilevamento

9.6.1. Scuotere il vetrino per eliminare il tampone in eccesso.

9.6.2. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.6.3. Applicare 200 µL di reagente probe di topo (flacone 3a) coprendo completamente l'area di deposito delle cellule.

9.6.4. Incubare per 20 minuti (±1 minuto).

9.6.5. Sciacquare i vetrini in TBST, 3 cambi, 2 minuti ciascuno.

9.6.6. Scuotere il vetrino per eliminare il tampone in eccesso.

9.6.7. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.6.8. Applicare 200 µL di reagente polimero (flacone 3b) coprendo l'area di deposito delle cellule.

9.6.9. Incubare per 20 minuti (±1 minuto).

9.6.10. Sciacquare i vetrini in bagno TBST, 3 cambi, 2 minuti ciascuno.

9.6.11. Scuotere il vetrino per eliminare il tampone in eccesso.

9.6.12. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.6.13. Applicare 200 µL di soluzione substrato-cromogeno (DAB) coprendo completamente l'area di deposito delle cellule.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.6.14. Incubare per 5 minuti (±1 minuto).

9.6.15. Sciacquare per 5 minuti in acqua deionizzata.

9.7. Colorazione di contrasto

9.7.1. Sciacquare i vetrini in TBST, 1 cambio per 2 minuti.

9.7.2. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.7.3. Applicare 200 µL di colorazione di contrasto a base di ematossilina (flacone 5) coprendo completamente l'area di deposito delle cellule.

9.7.4. Incubare per 1 minuto (±10 secondi).

9.7.5. Sciacquare i vetrini per 3 minuti in acqua corrente.

9.7.6. Porre i vetrini in una camera umida precedentemente preparata (riempita con salviette o garze inumidite con acqua).

9.7.7. Colorare di blu i vetrini applicando 200 µL di agente di colorazione (flacone 6) per 1 minuto (±10 secondi).

9.7.8. Ripetere il risciacquo in acqua corrente per 1 minuto.

9.8. Montaggio

9.8.1. Immergere i vetrini in etanolo 95 %, 1 minuto o 25 immersioni.

9.8.2. Immergere i vetrini in alcol assoluto, 4 cambi, 1 minuto ciascuno o 25 immersioni.

9.8.3. Chiarificare con xilene, 3 cambi, 1 minuto ciascuno o 25 immersioni.

9.8.4. Applicare il coprioggetti in vetro impiegando un mezzo di montaggio permanente non acquoso.

10. STABILITÀ

10.1. Se conservati alle temperature consigliate, i flaconi di reagente chiusi rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata sul contenitore.

10.2. Una volta aperti, i reagenti sono stabili per trenta giorni se conservati alle temperature consigliate.

11. CONTROLLO DI QUALITÀ

11.1. La variabilità dei risultati dipende spesso da una procedura di preparazione dei campioni diversa da quella descritta nelle procedure di test. Per ulteriori informazioni, consultare le linee guida di controllo di qualità proposte dal Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*.

11.2. Il SureDetect™ SiHa Cell Control è disponibile come controllo positivo presso TriPath Imaging, Inc. Ciascun flacone contiene una linea cellulare di cancro cervicale, che viene impiegata in modo simile ai campioni clinici. Come controllo negativo è possibile utilizzare un controllo negativo universale di IgG di topo. A ciascuna procedura di colorazione è allegato un vetrino per il controllo positivo e negativo. I risultati di colorazione devono essere usati come indicazione della validità della fase di colorazione.

12. INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE

12.1. Campioni di paziente e di controllo: il citologo o il patologo dovranno valutare i vetrini colorati tramite microscopio ottico. Le cellule possono essere visionate manualmente o conservate in una galleria di immagini elettroniche ottenute tramite il microscopio ottico.

12.2. Vetrini di controllo: i vetrini di controllo positivo e negativo devono essere esaminati prima della valutazione dei campioni dei pazienti per verificare che tutti i reagenti abbiano funzionato correttamente. La presenza di un prodotto di reazione marrone (3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro, DAB) nei nuclei del vetrino di controllo cellulare SiHa colorato con test SurePath® con ProEx™ C Test indica una reattività positiva. Il vetrino di controllo negativo di IgG di topo universale colorato con SurePath® con ProEx™ C Test non deve mostrare alcun nucleo colorato di marrone e deve mostrare colorazione solo per ematossilina.

12.3. La valutazione dei vetrini è una procedura a 4 fasi.

Fase 1: Il campione è adeguato?
Il Bethesda System (TBS) per la Refertazione della Citologia Cervicale (seconda edizione) dichiara che "An adequate liquid-based preparation should have an estimated minimum of at least 5000 well-visualized/well-preserved squamous cells" (una corretta preparazione a base liquida deve contenere un minimo previsto di 5000 cellule squamose ben visualizzabili e ben conservate). Lo stesso criterio deve essere applicato ai vetrini SurePath® con ProEx™ C. Tuttavia, analogamente ad una preparazione Pap convenzionale, qualunque campione con cellule anomale che mostri una reazione molecolare positiva, viene automaticamente considerato soddisfacente per la valutazione. Se a questo punto la risposta è "sì", passare alla fase successiva; se invece la risposta è "no" il risultato è ***Non soddisfacente per la valutazione***.

Fase 2: Appare una colorazione nucleare da moderata a intensa nelle cellule epiteliali?
Per rispondere "sì" a questa domanda, cercare una colorazione marrone ben definita. Una colorazione marrone debole o sfumata non è sufficiente a garantire un risultato positivo. Se non appare alcuna colorazione nucleare marrone, il risultato viene considerato ***Negativo***. Se appare una corretta colorazione marrone, procedere alla fase successiva.

Fase 3: La cellula con colorazione nucleare marrone è una cellula squamosa o ghiandolare?
Se la risposta è affermativa, procedere alla fase successiva. Se la risposta è negativa, si tratta di un risultato ***Negativo***.

Fase 4: La cellula è ≥ ASC (cellula squamosa atipica) o AGC (cellula ghiandolare atipica)?
Adottare lo stesso criterio morfologico indicato nel Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (seconda edizione) per determinare se la cellula squamosa contenente il nucleo marrone è ≥ ASC (cellula squamosa atipica). Se la cellula è considerata ≥ ASC (o ≥ AGC), si sarà ottenuto un risultato ***Positivo***. Ciò comprende ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e cancro. Se la cellula ha un aspetto ghiandolare, viene applicato il criterio del TBS per determinare se la cellula è ≥ AGC (cellula ghiandolare atipica). Questo comprende AGC endocervicale, AGC endometriale, AIS, e adenocarcinoma. Se la cellula in questione è morfologicamente definibile NILM (negativa per lesioni intraepiteliali o patologie maligne), il risultato del test è ***Negativo***.

13. BIBLIOGRAFIA

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. Il sistema Bethesda per refertare la citologia cervicale. Definizioni, criteri morfologici e note esplicative. Seconda Edizione. CIC Edizioni Internazionali, Roma 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. GLOSSARIO DEI SIMBOLI

REF	Codice
IVD	Per uso diagnostico *in vitro*
	Consultare le istruzioni per l'uso
Σ	Contiene 75 test
	Attenzione, consultare la documentazione allegata
	Limiti delle temperature di conservazione
LOT	Codice lotto
	Utilizzare entro AAAA-MM-GG o AAAA-MM
	Produttore

SUPPORTO TECNICO

USA
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP
Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Sviluppato con tecnologia fornita da Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ sono marchi di fabbrica di Millennium Pharmaceuticals, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Reagenti di rilevamento forniti da

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® è un prodotto e marchio registrato di TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate sono prodotti e marchi di fabbrica di TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF 490500
490501

Σ 75

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. BEOOGD GEBRUIK

De SurePath® met ProEx™ C immunocytochemische test is bedoeld voor de kwalitatieve evaluatie van afwijkende S-fase-inductie in cervicale cytologiemonsters verzameld in SurePath® Preservative Fluid. De testresultaten leveren aanvullende informatie voor cervicale cytologiediagnose.

2. SAMENVATTING EN UITLEG

Minichromosome maintenance (MCM)-proteïnen spelen een essentiële rol in replicatie van eukaryotisch DNA. Elke MCM-proteïne heeft DNA-afhankelijke ATP-ase motieven in zijn zeer goed geconserveerde centrale domein. Het MCM-proteïnegehalte neemt gewoonlijk op variabele wijze toe, omdat normale cellen zich ontwikkelen van G0 tot de G1/S-fase van de celcyclus. Topo-isomerase II alfa (TOP2A) is een essentieel nucleair enzym dat betrokken is bij DNA-replicatie en het doel is voor talrijke antikanker-geneesmiddelen die worden gebruikt bij de behandeling van kanker. Verminderde expressie van TOP2A is een belangrijk mechanisme van resistentie tegen diverse chemotherapeutische agentia. Een significante variatie in het expressiebereik van deze proteïne wordt waargenomen bij vele verschillende tumoren. TOP2A is predominant in prolifererende cellen en wordt gewijzigd in M-fase door fosforylatie op specifieke locaties, hetgeen cruciaal is voor mitotische chromosoomcondensatie en -segregatie.

ProEx™ C-antilichaamcocktail bevat muis-monoklonale anti-MCM2 en anti-TOP2A, gezuiverd uit weefselcultuursupernatans en verdund in gebufferde zoutoplossing met proteïnestabilisatoren en 0,09 % natriumazide.

3. PRINCIPES VAN DE PROCEDURE

De SurePath® met ProEx™ C immunocytochemische testkit bevat een antilichaamcocktail, detectie- en achtergrondkleuringreagentia die vereist zijn voor het voltooien van een driestaps handmatige of geautomatiseerde immunocytochemische kleuringsprocedure voor op gebruikelijke wijze bereide dunne laag cervicaal materiaal. Na incubatie van het monster met een muisantilichaamcocktail met beschermde merknaam, wordt een selectieve monoklonale antilichaambinding, duidend op een positieve test, gevisualiseerd met behulp van een uniek, gebruiksklaar, enzym-gekoppeld antilichaam-chromogeensysteem. Het enzymreagens is een secundair geit-anti-muis horseradish peroxidaseconjugaat gekoppeld aan een dextraanpolymeer backbone. Toevoeging van een specifiek chromogeen resulteert in de vorming van een zichtbaar chromogeen-product in de antigeen-antilichaam bindende gebieden. Op het monster wordt vervolgens achtergrondkleuring toegepast met hematoxyline, er wordt een blauwkleurend agens gebruikt en op het objectglaasje wordt een dekglaasje geplaatst. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van een lichtmicroscoop. Een positief resultaat duidt op een hoge graad cervicale aandoening en wordt bereikt wanneer de nucleus in belangrijke cellen bruin kleurt.

Een referentiegalerij van potentieel positieve objectglaasjes kan worden aangemaakt met behulp van geautomatiseerde beeldvormingsapparatuur. De galerij kan vervolgens worden bekeken om een positief of negatief resultaat vast te stellen.

De SurePath® met ProEx™ C immunocytochemische test kan zowel worden gebruikt voor handmatige als voor geautomatiseerde kleuring.

4. GELEVERDE REAGENTIA

Het volgende materiaal wordt geleverd en is voldoende voor 75 dunne laag preparaten:

Flacon-nr.	Beschrijving	🌡
1a	**Peroxidaseblok:** Gebufferde hydrogeenperoxide plus stabilisator en merkcomponenten	2–8 °C
1b	**Proteïneblok:** Gezuiverde caseïne plus merkcombinatie van proteïnen in gemodificeerd PBS met conserveringsmiddel en surfactans	2–8 °C
2	**Antilichaamcocktail:** Gebruiksklare monoklonale antilichaamcocktail geleverd in Tris-gebufferde oplossing met Tween 20, pH 7,4. Bevat stabiliserende proteïnen en antimicrobieel agens.	2–8 °C
3a	**Muisprobe:** Bindt aan muis-monoklonale antilichamen	2–8 °C
3b	**Polymeer reagens:** Polymeer geconjugeerd met horseradish peroxidase dat bindt aan muisprobe-reagens	2–8 °C
4a	**DAB-buffersubstraat:** substraatbuffer gebruikt bij de bereiding van het DAB-chromogeen	2–8 °C
4b	**DAB:** 3,3'-diaminobenzidine chromogeenoplossing	2–8 °C
5	**Hematoxyline:** Mayer's hematoxyline op waterbasis	15–30 °C
6	**Blauwkleurend agens:** Tris-gebufferde zoutoplossing, pH 7,4 met Tween 20 en 0,09% NaN_3	15–30 °C

5. VEREISTE MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN EN REAGENTIA

- Absorberende doekjes
- SureDetect™ SiHa Cell Line – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Gemineraliseerd of gedistilleerd water
- Ethanol (95 % en 100 %)
- Glazen dekglaasjes
- Handschoenen
- Bevochtigingskamer
- Lichtmicroscoop (10x, 20x (optioneel), 40x objectieven)
- Preparatiemedia
- Pipetten en pipettips (voor volumeafgifte van 20 µL, 200 µL en 1000 µL)
- SureDetect™-preparaatvoorbereidingsbuffer 10X – REF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – voorbehandelingbuffer
- Kleuringflessen of -baden
- Timer (met mogelijkheid voor intervallen van 1-60 minuten)
- Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS)
- Tween 20
- Universele muis-IgG negatieve controle
- Vortexer
- Xyleen of xyleenvervangers
- Stomer/waterbad

6. WAARSCHUWINGEN

Xn—Schadelijk	Chloraalhydraat ***R-zinnen:*** *22 Schadelijk bij opname door de mond.* ***S-zinnen:*** *23 Gas/rook/damp/spuitnevel niet inademen.* *25 Aanraking met ogen vermijden.* *36 Geschikte beschermende kleding dragen.* *45 Bij ongeval of indien men zich onwel voelt, onmiddellijk een arts raadplegen (indien mogelijk dit etiket tonen).* *60 Deze stof en/of de verpakking als gevaarlijk afval afvoeren.*
Xn—Schadelijk	3,3-diaminobenzidine ***R-zinnen:*** *22 Schadelijk bij opname door de mond.* *40 Carcinogene effecten zijn niet uitgesloten.* ***S-zinnen:*** *23 Gas/rook/damp/spuitnevel niet inademen.* *36/37 Geschikte handschoenen en beschermende kleding dragen.* *60 Deze stof en/of de verpakking als gevaarlijk afval afvoeren*

7. VOORZORGSMAATREGELEN

7.1. Voor *in-vitro*diagnostiek.

7.2. Voorbereide SurePath®-objectglaasjes moeten na voorbereiding direct in de voorbehandelingsbuffer worden geplaatst. De objectglaasjes moeten ten minste 1 uur, maar niet langer dan 72 uur voorafgaand aan immunocytochemie in de voorbehandelingsbuffer blijven.

7.3. Laat de objectglaasjes tijdens de procedure niet uitdrogen. Objectglaasjes die tijdens de procedure hebben kunnen uitdrogen, kunnen meer achtergrondkleuring vertonen.

7.4. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) is geclassificeerd als een verdacht carcinogeen met het potentiële risico dat onomkeerbare effecten worden geproduceerd. Vermijd lichamelijk contact en langdurige of herhaalde blootstelling. Een beschermkap tegen chemische gassen wordt ten zeerste aanbevolen. Laat het niet in de ogen, op de huid of op kleding komen. Handen grondig wassen na hanteren van de materialen. DAB-werkoplossing dient te worden bereid volgens de bijsluiter in de verpakking.

7.5. Sommige reagentia in deze kit bevatten natriumazide (NaN_3), een chemische stof die in zuivere vorm uiterst giftig is. Natriumazide kan dodelijk zijn als het wordt ingeslikt of geabsorbeerd via de huid. Deze reagentia zijn schadelijk bij inademing. Deze reagentia zijn gevaarlijke vaste stoffen. Veroorzaakt irritatie aan huid, ogen en luchtwegen. Tast het centrale zenuwstelsel, nieren en cardiovasculaire systeem aan. Hoewel natriumazide in productconcentraties niet wordt geclassificeerd als gevaarlijk, kan het toch reageren met loden en koperen leidingen, waarbij uiterst explosieve metaalaziden worden gevormd. Bij het afvoeren naspoelen met ruime hoeveelheden water om ophoping van aziden in de leidingen te voorkomen.

7.6. Hematoxyline en blauwkleurend agens: deze reagentia zijn schadelijk als ze worden ingeslikt. Hematoxyline en blauwkleurend agens zijn irriterend voor ogen, huid en luchtwegen.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.7. Monsters en alle aan monsters blootgestelde materialen dienen te worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen te worden verwijderd. Reagentia nooit met de mond pipetteren en contact van reagentia en monsters met de huid en slijmvliezen vermijden. Indien reagentia in contact komen met gevoelige plekken, dient u deze met een ruime hoeveelheid water te wassen.

7.8. Beperk microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum om niet-specifieke kleuring te vermijden.

7.9. Andere incubatietijden, -temperaturen of –methoden dan vermeld kunnen leiden tot onjuiste resultaten.

7.10. Reagentia zijn verdund voor een optimale werking. Verdere verdunning kan resulteren in verminderde antigeenkleuring.

7.11. Kitonderdelen zijn specifiek voor de partij. Vervang geen kitonderdelen door onderdelen met andere partijnummers. Partijnummers staan op de verpakkingsetiketten vermeld.

7.12. Gebruik de SurePath® met ProEx™ C-testkit niet na de uiterste gebruiksdatum op de verpakking. Als reagentia bewaard worden onder andere omstandigheden dan vermeld in de productbijsluiter, moeten de omstandigheden door de gebruiker worden gecontroleerd.

7.13. Er zijn geen duidelijke aanwijzingen voor degradatie van dit product. U dient daarom tegelijk met de patiëntmonsters positieve en negatieve controles uit te voeren. Als er onverwachte kleuring wordt vastgesteld die niet verklaard kan worden door variaties in de laboratoriumprocedures of als er een probleem met de SurePath® met ProEx™ C-testkit wordt vermoed, neemt u contact op met de technische ondersteuning van TriPath Imaging.

7.14. Draag de juiste beschermende uitrusting om contact van reagentia met ogen en huid te vermijden. Zie het veiligheidsinformatieblad voor verdere informatie.

7.15. De SurePath® met ProEx™ C-test is bedoeld voor gebruik met cervicale cytologiemonsters verzameld in SurePath® Preservative Fluid. Compatibiliteit met andere conventionele en monolayer-preparaten dan SurePath® is niet vastgesteld.

8. INSTRUCTIES VOOR GEBRUIK

8.1. Voorbereiding van het monster

8.1.1. Raadpleeg de Bedieningshandleiding voor het SurePath® PrepStain System voor instructies met betrekking tot de voorbereiding van objectglaasjes van residuale SurePath® cervicale cytologiemonsters.

8.1.2. Voeg 8 mL SurePath® Preservative Fluid toe aan het residuale monster in de SurePath®-flacon (ongeveer 2 mL). Het verdunde monster dient op de BD PrepMate™ te worden verwerkt met gebruik van de standaardtechniek en op de PrepStain™.

8.1.3. Voorbereide SurePath®-objectglaasjes dienen direct na voorbereiding in de SureDetect™-preparaatvoorbereidingsbuffer te worden geplaatst (zie de SureDetect™-preparaatvoorbereidingsbuffer 10x voor richtlijnen voor de voorbereiding van een werkoplossing voor objectglaasjes). De objectglaasjes moeten ten minste 1 uur, maar niet langer dan 72 uur voorafgaand aan immunocytochemie in de buffer blijven.

8.1.4. Er dient een epitoopversterkingsprocedure te worden gebruikt voor een optimale werking van de kit. Deze procedure bestaat uit het onderdompelen van voorbereide objectglaasjes in een werkoplossing van SureDetect™-preparaatvoorbereidingsbuffer gedurende minimaal 1 uur bij kamertemperatuur, gevolgd door verhitting van de objectglaasjes in de voorbehandelingbuffer tot 95 °C. De objectglaasjes worden gedurende 15 minuten op 95 °C gehouden en dienen vervolgens gedurende 20 minuten af te koelen bij kamertemperatuur. Het gebruik van een gekalibreerd waterbad of groentestomer wordt aanbevolen om de vereiste temperatuur te behouden. Laboratoria die zich op grotere hoogten bevinden, dienen de beste methode vast te stellen voor het behouden van de vereiste temperatuur. De kleuringsprocedure dient onmiddellijk na de epitoopversterking en de afkoeling te worden opgestart. Afwijking van de omschreven procedure kan de resultaten nadelig beïnvloeden.

8.2. Reagensvoorbereiding

8.2.1. Bereid de volgende reagentia voor voorafgaand aan de kleuring.

8.2.2. Tris-gebufferde zoutoplossing met Tween 0,05 % (TBST)

8.2.2.1. Bereid de TBS voor overeenkomstig de specificaties van de fabrikant.

8.2.2.2. Voeg Tween 20 toe, indien nog niet aanwezig in de TBS, tot een eindconcentratie van 0,05 %.

8.2.3. Substraat-chromogeenoplossing (DAB) (volume voldoende voor 5 objectglaasjes)

8.2.3.1. Doe 1 mL DAB-substraatbuffer (flacon 4a) in een testbuisje.

8.2.3.2. Voeg één druppel (20–30 µL) DAB-chromogeen (flacon 4b) toe. Meng zorgvuldig en breng aan op de objectglaasjes met behulp van een pipet.

8.2.3.3. Bereid dagelijks vers substraat-chromogeen.

8.2.3.4. De kleuringkwaliteit wordt niet beïnvloed door precipitaat dat zich in de oplossing kan ontwikkelen.

9. KLEURINGSPROTOCOL (uitgevoerd bij kamertemperatuur, 20-25 °C)

9.1. Opmerkingen kleuringsprocedure

9.1.1. Lees deze instructies zorgvuldig door en stel uzelf voorafgaand aan gebruik op de hoogte van alle bestanddelen (zie Voorzorgsmaatregelen).

9.1.2. Alle reagentia dienen voorafgaand aan immunokleuring op kamertemperatuur (20–25 °C) te worden gebracht.

9.1.3. Alle incubaties moeten bij kamertemperatuur worden uitgevoerd, tenzij anders vermeld.

9.1.4. Laat de objectglaasjes tijdens de kleuringsprocedure niet uitdrogen. Uitgedroogde celpreparaten kunnen een verhoogde niet-specifieke kleuring vertonen. Bescherm de objectglaasjes tegen tocht. Objectglaasjes dienen in een bevochtigingskamer te worden geplaatst voor langdurige incubaties.

9.2. Epitoopversterkingl

9.2.1. Plaats de voorbereide objectglaasjes in een Coplin jar met een werkoplossing van SureDetect™-preparaatvoorbereidingsbuffer gedurende minimaal 1 uur en maximaal 72 uur.

9.2.2. Incubeer in een waterbad of stomer gedurende 15 minuten bij 95 °C.

9.2.3. Haal de gehele Coplin jar met de objectglaasjes uit het waterbad of stomer en laat de objectglaasjes gedurende 20 minuten afkoelen in de buffer.

9.2.4. Spoel de objectglaasjes af met gedemineraliseerd H_2O en breng ze over naar een schone Coplin jar met TBST.

9.3. Blokkeerreagens

9.3.1. Tik overmatige buffer af.

9.3.2. Laad de objectglaasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.3.3. Gebruik 200 µl peroxidase blokkeerreagens (flacon 1a) om het celafzettingsgebied te bedekken.

9.3.4. Incubeer gedurende 5 minuten (± 1 minuut).

9.3.5. Spoel de objectglaasjes in TBST, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

9.4. Proteïneblok

9.4.1. Tik overmatige buffer af.

9.4.2. Laad de objectglaasjes in de voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.4.3. Gebruik 200 µL proteïneblok (flacon 1b) om het celafzettingsgebied volledig te bedekken.

9.4.4. Incubeer gedurende 5 minuten (± 1 minuut).

9.4.5. NIET SPOELEN.

9.5. Primaire antilichaamcocktail

9.5.1. Tik overmatig proteïneblok af.

9.5.2. Laad de objectglaasjes in de voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.5.3. Gebruik 200 µL ProEx™ C-antilichaamcocktail (flacon 2) om het celafzettingsgebied volledig te bedekken.

9.5.4. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur.

9.5.5. Spoel elke objectglaasje afzonderlijk af met TBST met behulp van een wasfles (richt de stroom niet rechtstreeks op het celafzettingsgebied). Laad de objectglaasjes in een objectglaasjesrek.

9.5.6. Spoel de objectglaasjes in TBST, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

9.6. Detectiechemie

9.6.1. Tik overmatige buffer af.

9.6.2. Laad de objectglaasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.6.3. Gebruik 200 µL muisprobe-reagens (flacon 3a) om het celafzettingsgebied volledig te bedekken.

9.6.4. Incubeer 20 minuten (± 1 minuut).

9.6.5. Spoel de objectglaasjes in TBST, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

9.6.6. Tik overmatige buffer af.

9.6.7. Laad de objectglaasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.6.8. Gebruik 200 µL polymeerreagens (flacon 3b) om het celafzettingsgebied te bedekken.

9.6.9. Incubeer gedurende 20 minuten (± 1 minuut).

9.6.10. Spoel de objectglaasjes in TBST, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

9.6.11. Tik overmatige buffer af.

9.6.12. Laad de objectglaasjes in de voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.6.13. Gebruik 200 µL substraat-chromogeenoplossing (DAB) om het celafzettingsgebied volledig te bedekken.

9.6.14. Incubeer gedurende 5 minuten (± 1 minuut).

9.6.15. Spoel de objectglaasjes gedurende 5 minuten af in gedemineraliseerd H_2O.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.7. Achtergrondkleuring

9.7.1. Spoel de objectglaasjes in TBST, in 1 wisselbeurt van 2 minuten.

9.7.2. Laad de objectglaasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.7.3. Gebruik 200 µL hematoxyline achtergrondkleuring (flacon 5) om het celafzettingsgebied volledig te bedekken.

9.7.4. Incubeer gedurende 1 minuut (± 10 seconden).

9.7.5. Spoel de objectglaasjes gedurende 3 minuten af in stromend H_2O.

9.7.6. Laad de objectglaasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).

9.7.7. Kleur de objectglaasjes blauw met behulp van 200 µL blauwkleurend agens (flacon 6) gedurende 1 minuut (± 10 seconden).

9.7.8. Herhaal het spoelen onder stromend water gedurende 1 minuut.

9.8. Preparatie

9.8.1. Dompel de objectglaasjes onder in 95 % ethanol, gedurende 1 minuut of 25 onderdompelingen.

9.8.2. Dompel de objectglaasjes onder in absolute alcohol, in 4 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdompelingen.

9.8.3. Reinig met xyleen, in 3 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdompelingen.

9.8.4. Bedek de objectglaasjes met glazen dekglaasjes met een niet-waterig, permanent preparatiemedium.

10. STABILITEIT

10.1. Ongeopende reagentiaflacons zijn stabiel tot de op de flacon vermelde uiterste gebruiksdatum, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.

10.2. Na opening zijn de reagentia stabiel gedurende dertig dagen, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.

11. KWALITEITSCONTROLE

11.1. Variabiliteit in de resultaten is vaak te wijten aan verschillen in monsterbehandeling, die afwijkt van de aanbevolen testprocedures. Raadpleeg de door het Clinical and Laboratory Standards Institute voorgestelde richtlijnen voor kwaliteitscontrole, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*, voor aanvullende informatie.

11.2. SureDetect™ SiHa-celcontrole is bij TriPath Imaging, Inc. beschikbaar als positieve controle. Elke flacon bevat een baarmoederhalskankerlijn, die op dezelfde wijze wordt verwerkt als de klinische monsters. Een universele muis-IgG negatieve controle kan als negatieve controle worden gebruikt. Een objectglaasje voor positieve en negatieve controle dient in elke kleuringsprocedure te worden opgenomen. De kleuringsresultaten dienen te worden gebruikt als een indicatie voor de geldigheid van de kleuringsrun.

12. INTERPRETATIE VAN DE KLEURING

12.1. Patiënt- en controlemonsters: De gekleurde objectglaasjes dienen door een cytotechnoloog of patholoog te worden beoordeeld met behulp van een lichtmicroscoop. Cellen kunnen handmatig worden bekeken of opgeslagen in een elektronische beeldgalerij, verkregen met een lichtmicroscoop.

12.2. Controleglaasjes De objectglaasjes voor de positieve en negatieve controle moeten voorafgaand aan het bekijken van de patiëntmonsters worden onderzocht om er zeker van te zijn dat alle reagentia correct hebben gefunctioneerd. De aanwezigheid van een bruin reactieproduct (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) in de nucleus van het SiHa-celcontroleglaasje gekleurd met de SurePath® met ProEx™ C-test duidt op een positieve reactiviteit. Het objectglaasje voor negatieve controle met universele muis-IgG gekleurd met de SurePath® met ProEx™ C-test mag geen bruin gekleurde nucleus hebben en alleen kleuring uit de hematoxyline-achtergrondkleuring vertonen.

12.3. Het bepalen van de score van de objectglaasjes is een proces in 4 stappen.
Stap 1: Is het monster adequaat?
'The Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology' (2de uitgave) vermeldt: "Een adequaat preparaat op vloeistofbasis dient een geschat minimum van ten minste 5000 goed gevisualiseerde/goed geconserveerde plaveiselcellen bevatten." Dezelfde criteria dienen te worden toegepast op de SurePath® met ProEx™ C-objectglaasjes. Echter, net als bij elke gebruikelijke Pap-bereiding, is elk monster met abnormale cellen dat een positieve moleculaire reactie vertoont per definitie geschikt voor evaluatie. Indien het antwoord op deze stap 'Ja' is, gaat u naar de volgende stap; indien het antwoord 'Nee' is, dan is het resultaat ***Ongeschikt voor evaluatie.***

Stap 2: Is er matige tot intense bruine nucleaire kleuring in de epitheelcellen?
Om deze stap met 'Ja' te kunnen beantwoorden, kijkt u naar bruine kleuring die gemakkelijk gevisualiseerd wordt. Als er slechts een kleine hoeveelheid of 'glimpje' bruin te zien is, dan is dit niet voldoende om een positieve uitslag te garanderen. Als er geen bruine nucleaire kleuring is te zien, is het resultaat ***Negatief***. Als er duidelijke bruine kleuring wordt gevisualiseerd, gaat u verder naar de volgende stap.

Stap 3: Is de cel met nucleaire bruine kleuring een plaveiselcel of glandulaire cel?
Als het antwoord 'Ja' is, gaat u verder naar de volgende stap. Als het antwoord 'Nee' is, is het testresultaat ***Negatief***.

Stap 4: Is de cel een ≥ ASC (atypische plaveiselcel) of AGC (atypische glandulaire cel)?
Gebruik dezelfde morfologische criteria als omschreven in 'The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology' (2de uitgave) om te bepalen of de plaveiselcel met de bruine nucleus een ≥ ASC (atypische plaveiselcel) is. Als de cel wordt beschouwd als ≥ ASC (of ≥ AGC), dan is het testresultaat ***Positief***. Dit is met inbegrip van ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL en kanker. Als de cel een glandulaire cel is, zijn de TBS-criteria voor de bepaling of een cel ≥ AGC (atypische glandulaire cel) is, van toepassing. Dit is met inbegrip van endocervicale AGC, endometrium-AGC, AIS en adenocarcinoom. Als de cel in kwestie consistent is met NILM (negatief voor intra-epitheliale laesie of maligniteit), is het testresultaat ***Negatief***.

13. REFERENTIES

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. VERKLARING SYMBOLEN

REF	Catalogusnummer
IVD	Voor *in-vitro* diagnostiek
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
Σ	Voldoende voor 75 tests
	Voorzichtig, raadpleeg bijgevoegd document
	Temperatuurgrenzen voor opslag
LOT	Partijnummer
	Houdbaar tot JJJJ-MM-DD of JJJJ-MM
	Fabrikant

TECHNISCHE ONDERSTEUNING
Verenigde Staten
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215, VS

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Ontwikkeld met technologie van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ zijn handelsmerken van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 VS
www.millennium.com

Detectiereagentia geleverd door

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® is een product en geregistreerd handelsmerk van TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate zijn producten en handelsmerken van TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. TILSIGTET ANVENDELSE

SurePath® med ProEx™ C immuncytokemisk test er beregnet til kvalitativ evaluering af afvigende S-faseinduktion i cervikale cytologiske præparater, der er opsamlet i SurePath® Preservative Fluid. Testresultaterne giver supplerende oplysninger til den cervikale cytologiske diagnose.

2. RESUMÉ OG FORKLARING

Minikromosomvedligeholdelse (MCM) -proteiner spiller en vigtig rolle ved eukaryotisk DNA-replikation. Hvert af MCM-proteinerne har DNA-afhængige ATPase-motiver i deres særdeles velbevarede centrale domæne. Niveauet af MCM-proteiner stiger generelt på forskellig måde i takt med, at normale celler fortsætter fra G0- til G1/S fasen i cellecyklen. Topoisomerase II alpha (TOP2A) er et vigtigt nukleært enzym, der er involveret i DNA-replikation og er et mål for mange præparater, der anvendes til cancerbehandling. Formindsket udtryk af TOP2A er en dominerende modstandsmekanisme over for adskillige kemoterapeutiske præparater. Der er observeret en signifikant variation i udtrykket af dette protein i mange forskellige tumorer. TOP2A er dominerende i prolifererende celler og modificeres i M-fase ved phosphorylering på forskellige steder, hvilket er afgørende for mitotisk kromosomkondensation og -adskillelse.

ProEx™ C antistofcocktail indeholder monoklonalt anti-MCM2 og anti-TOP2A fra mus, som er oprenset fra vævskultursupernatant og fortyndet i en bufferet saltvandsopløsning, som indeholder proteinstabilisatorer og 0,09 % natriumazid.

3. PROCEDUREPRINCIPPER

SurePath® med ProEx™ C immuncytokemisk testkit indeholder en antistofcocktail, påvisnings- og kontrastfarvningsreagenser, der er nødvendige for at fuldføre en tre-trins manuel eller automatisk immuncytokemisk farvningsprocedure for rutinemæssigt forberedte tynde lag af cervikale præparater. Efter inkubation af præparatet med en navnebeskyttet muse-antistofcocktail visualiseres selektiv monoklonal antistofbinding, der er tegn på en positiv test, med et unikt enzymbundet antistof-kromogensystem, der er klart til brug. Enzymreagenset er et sekundært gede-anti-mus, peberrodsperoxidase-konjugat, der er kædet til en dextranpolymer-rygrad. Tilsættelsen af et specifikt kromogen resulterer i dannelsen af et synligt kromogenprodukt, som findes ved antigen-antistoffets bindingssteder. Præparatet kontrastfarves herefter med hæmatoxylin; der tilføres et blåfarvningsmiddel, og der sættes dækglas på objektglasset. Resultaterne fortolkes ved hjælp af lysmikroskopi. Et positivt resultat, der er tegn på high-grade cervikal sygdom, er opnået, når kernerne i de relevante cellerne farves brune.

Der kan oprettes et referencegalleri med potentielle positive objektglas med anvendelse af automatisk billedbehandlingsudstyr. Galleriet kan derefter gennemgås for at finde et positivt eller negativt resultat.

SurePath® med ProEx™ C immuncytokemisk test er egnet til både manuel og automatisk farvning.

4. LEVEREDE REAGENSER

Følgende materialer er inkluderet og rækker til 75 præparater i tynde lag:

Hætteglas nr.	Beskrivelse	
1a	**Peroxidaseblokering:** Bufferet hydrogenperoxid samt stabilisator og navnebeskyttede komponenter	2-8 °C
1b	**Proteinblokering:** Oprenset casein samt en navnebeskyttet kombination af proteiner i modificeret PBS (phosphatbufferet saltvand) med konserveringsmiddel og overfladeaktivt stof	2-8 °C
2	**Antistofcocktail:** Monoklonal antistofcocktail klar til brug leveret i TRIS-bufferet opløsning med Tween 20, pH-værdi 7,4. Indeholder stabiliserende proteiner og antimikrobielt middel	2-8 °C
3a	**Museprobe:** Binder til muse-monoklonale antistoffer	2-8 °C
3b	**Polymerreagens:** Polymer konjugeret med peberrodsperoxidase, der binder til museprobereagens	2-8 °C
4a	**DAB buffersubstrat:** Substratbuffer anvendes ved klargøring af DAB-kromogenet	2-8 °C
4b	**DAB:** 3,3'-diaminobenzidin kromogenopløsning	2-8 °C
5	**Hematoxylin:** Vandbaseret Mayers hæmatoxylin	15-30 °C
6	**Blåfarvningsmiddel:** Tris-bufferet saltvand, pH-værdi 7,4 med Tween 20 og 0,09 % NaN_3	15-30 °C

5. NØDVENDIGE MATERIALER OG REAGENSER, DER IKKE MEDFØLGER

- Absorberende engangsklude
- SureDetect™ SiHa cellelinje – katalognummer 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Demineraliseret eller destilleret vand
- Ethanol (95 % og 100 %)
- Dækglas
- Handsker
- Fugtkammer
- Lysmikroskop (10x, 20x (valgfrit), 40x objektiver)
- Monteringsmedie
- Pipetter og pipettespidser (som kan levere volumenmængder på 20µl, 200 µl og 1000 µl)
- SureDetect™ buffer til klargøring af objektglas 10X – katalognummer 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – forbehandlingsbuffer
- Krukker eller baljer til farvning
- Minutur (skal kunne indstilles til intervaller på 1-60 minutter)
- Tris-bufferet saltvand (TBS)
- Tween 20
- Universal muse-IgG negativ kontrol
- Omryster
- Xylen eller xylenerstatninger
- Dampkoger/ vandbad

6. ADVARSLER

Xn – Skadelig	Kloralhydrat ***Risikosætninger:*** *22 Farlig ved indtagelse.* ***Sikkerhedssætninger:*** *23 Undgå indånding af gas/røg/dampe/aerosoltåger.* *25 Undgå kontakt med øjne.* *36 Brug særligt arbejdstøj.* *45 Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig.* *60 Dette materiale og dets beholder skal bortskaffes som farligt affald.*
Xn – Skadelig	3,3 diaminobenzidin ***Risikosætninger:*** *22 Farlig ved indtagelse.* *40 Mulighed for kræftfremkaldende effekt.* ***Sikkerhedssætninger:*** *23 Undgå indånding af gas/røg/dampe/aerosoltåger.* *36/37 Brug særligt arbejdstøj/egnede beskyttelseshandsker under arbejdet.* *60 Dette materiale og dets beholder skal bortskaffes som farligt affald*

7. FORSIGTIGHEDSREGLER

7.1. Til *in vitro* diagnostisk brug.

7.2. Klargjorte SurePath® objektglas skal placeres i forbehandlingsbufferen, så snart de er klargjort. Objektglassene skal blive i forbehandlingsbufferen i mindst 1 time, men ikke i længere end 72 timer inden immuncytokemi.

7.3. Lad ikke objektglassene tørre ud på noget tidspunkt under proceduren. Objektglas, der har været tørret ud under proceduren, kan udvise forøget baggrundsfarvning.

7.4. 3,3'-diaminobenzidin (DAB) er klassificeret som et muligt karcinogent stof med risiko for frembringelse af irreversible virkninger. Undgå fysisk kontakt og længerevarende eller gentagen eksponering. Det anbefales kraftigt at anvende et kemisk aftrækksskab. Må ikke komme i kontakt med øjne, hud eller tøj. Vask hænderne grundigt efter håndtering. DAB-arbejdsopløsning skal tilberedes i henhold til indlægssedlen.

7.5. Nogle reagenser i dette kit indeholder natriumazid (NaN_3), et kemikalium, der er meget giftigt i ren form. Natriumazid kan være dødbringende, hvis det sluges eller absorberes gennem huden. Disse reagenser er skadelige ved indånding. Disse reagenser er farlige faststoffer. Medfører irritation for øjne, hud og luftveje. Påvirker centralnervesystemet, nyrerne og hjertekarsystemet. Selvom koncentrationen i produktet ikke er klassificeret som farlig, kan ophobning af natriumazid reagere med bly og kobber og danne meget eksplosive metalazider. Efter bortskaffelse skylles med rigelige mængder vand for at hindre ophobning af azid i afløb.

7.6. Hæmatoxylin og blåfarvningsmiddel: Disse reagenser er skadelige ved indtagelse. Hæmatoxylin og blåfarvningsmidler er irriterende for øjne, hud og luftveje.

7.7. Præparater og alle materialer, der kommer i kontakt med præparaterne, skal behandles som potentielt infektiøst og bortskaffes med anvendelse af passende forholdsregler. Afpipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at hud og slimhinder kommer i kontakt med reagenser og præparater. Hvis reagenser kommer i kontakt med følsomme områder, skal disse afvaskes med rigelige mængder vand.

7.8. Forebyg mikrobiel kontaminering af reagenserne for at undgå uspecifik farvning.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.9. Andre inkubationstider, -temperaturer eller -metoder end de angivne kan give fejlagtige resultater.

7.10. Reagenserne er fortyndede for at opnå optimal ydeevne. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning.

7.11. Kitkomponenter er lotspecifikke. Kitkomponenter må ikke erstattes med andre lotnumre. Lotnumre er angivet på emballagens mærkning.

7.12. Anvend ikke SurePath® med ProEx™ C testkittet efter den udløbsdato, der er trykt på emballagen. Brugeren skal validere betingelserne, hvis reagenserne opbevares under andre betingelser end dem, der er angivet i indlægssedlen.

7.13. Der findes ingen umiddelbare tegn, der viser en eventuel forringelse af dette produkt. Der bør derfor køres positive og negative kontroller samtidigt med patientprøver. Kontakt TriPath Imaging teknisk support, hvis der observeres uventet farvning, som ikke kan forklares med variationer i laboratorieprocedurerne, eller hvis der opstår mistanke om et problem med SurePath® med ProEx™ C testkittet.

7.14. Brug egnet personligt beskyttelsesudstyr for at undgå, at reagenserne kommer i kontakt med øjne og hud. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger.

7.15. SurePath® med ProEx™ C testen er beregnet til anvendelse med cervikale cytologiske præparater, der opsamles i SurePath® konserveringsvæske. Kompatibilitet med konventionelle og enkeltlagspræparater af andre typer end SurePath® er ikke blevet vurderet.

8. BRUGSANVISNING

8.1. Klargøring af præparater

8.1.1. Der henvises til brugervejledningen til SurePath® PrepStain System for anvisninger vedrørende klargøring af objektglas fra overskydende SurePath® cervikale cytologiske præparater.

8.1.2. Tilsæt 8 ml SurePath® konserveringsvæske til den resterende prøve i SurePath® hætteglasset (ca. 2 ml). Den fortyndede prøve skal behandles i BD PrepMate™ med anvendelse af standardteknikken og i PrepStain.

8.1.3. Præparerede SurePath® objektglas skal være placeret i SureDetect™ buffer til præparering af objektglas, så snart de er præpareret (der henvises til SureDetect™ buffer til præparering af objektglas 10X for anvisninger til præparering af en objektglas-arbejdsopløsning). Objektglassene skal blive i bufferen i mindst 1 time, men ikke i længere end 72 timer inden immuncytokemi.

8.1.4. En procedure for epitop-retrieval skal anvendes for at opnå en optimal ydeevne for kittet. Denne procedure involverer iblødsætning af præparerede objektglas i en arbejdsopløsning med SureDetect™ buffer til præparering af objektglas i mindst 1 time ved stuetemperatur efterfulgt af opvarmning af objektglassene i forbehandlingsbuffer til 95 °C. Objektglassene holdes ved 95 °C i 15 minutter, hvorefter de køles af ved stuetemperatur i 20 minutter. Det anbefales at anvende et kalibreret vandbad eller en dampkoger, der kan fastholde den påkrævede temperatur. Laboratorier, der er højt beliggende over havets overflade, skal fastlægge den bedste metode til opretholdelse af den påkrævede temperatur. Farvningsproceduren skal påbegyndes umiddelbart efter epitop-retrieval og afkøling. Afvigelser fra den angivne procedure kan have en negativ indflydelse på resultaterne.

8.2. Klargøring af reagenserne

8.2.1. Klargør følgende reagenser inden farvning.

8.2.2. Tris-bufferet fysiologisk saltvand med 0,05 % Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. Klargør TBS i overensstemmelse med producentens specifikationer.

8.2.2.2. Tilsæt Tween 20 til en endelig koncentration på 0,05 %, hvis det ikke allerede er i TBS.

8.2.3. Substrat-kromogenopløsning (DAB) (mængde, der rækker til 5 objektglas)

8.2.3.1. Overfør 1 ml DAB substratbuffer (hætteglas 4a) til et reagensglas.

8.2.3.2. Tilsæt én dråbe (20-30 µl) DAB-kromogen (hætteglas 4b). Bland grundigt og overfør til objektglassene med en pipette.

8.2.3.3. Klargør en ny substrat-kromogenopløsning dagligt.

8.2.3.4. Farvningskvaliteten påvirkes ikke af bundfald, der kan dannes i opløsningen.

9. FARVNINGSPROTOKOL (udføres ved stuetemperatur, 20-25 °C)

9.1. Noter om farvningsproceduren

9.1.1. Læs omhyggeligt alle disse anvisninger og få kendskab til alle komponenter inden brug (se Forsigtighedsregler).

9.1.2. Alle reagenser skal have stuetemperatur (20-25 °C) inden immunfarvning.

9.1.3. Alle inkubationer skal udføres ved stuetemperatur, medmindre andet er angivet.

9.1.4. Lad ikke objektglassene tørre ud under farvningsproceduren. Udtørrede cellepræparater kan udvise forøget uspecifik farvning. Beskyt objektglas, der kan være udsat for træk. Objektglas skal anbringes i et fugtkammer ved længerevarende inkubationer.

9.2. Epitop-retrieval

9.2.1. Anbring præparerede objektglas i en Coplin-skål, der indeholder en arbejdsopløsning bestående af SureDetect™ buffer til præparering af objektglas i mindst 1 time og op til højst 72 timer.

9.2.2. Inkuber i et vandbad eller en dampkoger i 15 minutter ved 95 °C.

9.2.3. Tag hele Coplins-skålen med objektglassene op af vandbadet eller dampkogeren og lad objektglassene køle af i bufferen i 20 minutter.

9.2.4. Skyl objektglassene med demineraliseret H_2O, og læg dem i en ren Coplin-skål med TBST.

9.3. Blokeringsreagens

9.3.1. Bank overskydende buffer af.

9.3.2. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.3.3. Tilsæt 200 µl peroxidaseblokeringsreagens (hætteglas 1a), så det dækker celledeponeringsarealet.

9.3.4. Inkuber i 5 minutter (±1 minut).

9.3.5. Skyl objektglassene i 3 hold TBST; 2 minutter for hvert hold.

9.4. Proteinblokering

9.4.1. Bank overskydende buffer af.

9.4.2. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.4.3. Tilsæt 200 µl proteinblokering (hætteglas 1b), så det dækker celledeponeringsarealet.

9.4.4. Inkuber i 5 minutter (±1 minut).

9.4.5. MÅ IKKE SKYLLES.

9.5. Primær antistofcocktail

9.5.1. Bank overskydende proteinblokering af.

9.5.2. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.5.3. Tilsæt 200 µl ProEx™ C Ab Cocktail (hætteglas 2), så det dækker celledeponeringsarealet.

9.5.4. Inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur.

9.5.5. Skyl hvert enkelt objektglas med TBST vha. en vaskeflaske (ret ikke flowet direkte mod celledeponeringsarealet). Sæt objektglassene i et objektglasstativ.

9.5.6. Skyl objektglassene i 3 hold TBST; 2 minutter for hvert hold.

9.6. Påvisningskemi

9.6.1. Bank overskydende buffer af.

9.6.2. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.6.3. Tilsæt 200 µl museprobereagens (hætteglas 3a), så det dækker celledeponeringsarealet helt.

9.6.4. Inkuber i 20 minutter (±1 minut).

9.6.5. Skyl objektglassene i 3 hold TBST; 2 minutter for hvert hold.

9.6.6. Bank overskydende buffer af.

9.6.7. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.6.8. Tilsæt 200 µl polymerreagens (hætteglas 3b), så det dækker celledeponeringsarealet.

9.6.9. Inkuber i 20 minutter (±1 minut).

9.6.10. Skyl objektglassene i 3 hold TBST-bad; 2 minutter for hvert hold.

9.6.11. Bank overskydende buffer af.

9.6.12. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.6.13. Tilsæt 200 µl substrat-kromogenopløsning (DAB), så det dækker celledeponeringsarealet helt.

9.6.14. Inkuber i 5 minutter (±1 minut).

9.6.15. Skyl objektglassene i 5 minutter i demineraliseret H_2O.

9.7. Kontrastfarvning

9.7.1. Skyl objektglassene i 1 hold TBST; 2 minutter for hvert hold.

9.7.2. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.7.3. Tilsæt 200 µl hæmatoxylinkontrastfarvning (hætteglas 5), så det dækker celledeponeringsarealet helt.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.7.4. Inkuber i 1 minut (±10 sekunder).

9.7.5. Skyl objektglassene i 3 minutter i rindende H_2O.

9.7.6. Placer objektglassene i et forberedt fugtkammer (fyldt med vandfugtede papirhåndklæder eller gaze).

9.7.7. Foretag blåfarvning af objektglassene ved at tilsætte 200 µl blåfarvningsmiddel (hætteglas 6) i 1 minut (±10 sekunder).

9.7.8. Skyl med rindende vand igen i 1 minut.

9.8. Montering

9.8.1. Nedsænk objektglassene i 95 % ethanol i 1 minut eller 25 dyp.

9.8.2. Nedsænk objektglassene i 4 hold ren alkohol; 1 minut hver eller 25 dyp.

9.8.3. Rens med 3 hold xylen; 1 minut hver eller 25 dyp.

9.8.4. Dæk objektglassene med ikke-vandholdig, permanent monteringsmedie ved hjælp af dækglas.

10. STABILITET

10.1. Ved opbevaring ved de anbefalede temperaturer er uåbnede reagenshætteglas stabile indtil den udløbsdato, der er angivet på hætteglasset.

10.2. Efter åbning er reagenserne stabile i tredive dage, hvis de opbevares ved de anbefalede temperaturer.

11. KVALITETSKONTROL

11.1. Varians i resultaterne skyldes ofte forskelle i præparathåndteringen, som afviger fra de anbefalede testprocedurer. Yderligere oplysninger findes i de foreslåede retningslinjer for kvalitetskontrol fra Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*.

11.2. SureDetect™ SiHa cellekontrol kan fås som en positiv kontrol fra TriPath Imaging, Inc. Hvert hætteglas indeholder en cellelinje med cervikal cancer, som behandles på samme måde som kliniske præparater. En universal muse-IgG negativ kontrol kan anvendes som en negativ kontrol. Et positivt og negativt kontrolobjektglas bør inkluderes i hver farvningsprocedure. Farvningsresultaterne bør bruges som en indikation af validiteten af farvningskørslen.

12. FORTOLKNING AF FARVNINGEN

12.1. Patient- og kontrolprøver: En cytotekniker eller patolog skal evaluere de farvede objektglas med et lysmikroskop. Celler kan undersøges manuelt eller opbevares i et elektronisk billedgalleri, der er oprettet med anvendelse af et lysmikroskop.

12.2. Kontrolobjektglas: De positive og negative kontrolobjektglas skal undersøges inden gennemgang af patientprøverne for at sikre, at alle reagenser fungerede korrekt. Forekomst af et brunt reaktionsprodukt (3,3'-diaminobenzidintetrahydroklorid, DAB) i kernerne af SiHa cellekontrol-objektglas, der er farvet med SurePath® med ProEx™ C test, tyder på positiv reaktivitet. Objektglasset med universal muse-IgG negativ kontrol, der er farvet med SurePath® med ProEx™ C test, bør ikke have kerner, der er farvet brune, men må kun være farvet af hæmatoxylinkontrastfarven.

12.3. Bedømmelse af objektglas er en 4-trins-proces.

Trin 1: Er præparatet fyldestgørende?
Bethesda-systemet (TBS) til indberetning af cervikal cytologi (Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) oplyser: "Et fyldestgørende væskebaseret præparat skal have en anslået minimumsmængde på mindst 5000 pladeceller, der er velbevarede og tydeligt kan visualiseres". De samme kriterier bør gøres gældende for SurePath® med ProEx™ C objektglas. Men som det er tifældet med rutinemæssige pap-præparater, er alle præparater med unormale celler, som udviser en positiv molekylær reaktion, pr. definition tilfredsstillende til evaluering. Fortsæt til næste trin, hvis svaret på dette trin er "ja". Hvis svaret er "nej", er resultatet ***Utilfredsstillende til evaluering***.

Trin 2: Er der moderat til intens brun kernefarvning i epitelcellerne?
Se efter den brune farvning, som nemt kan visualiseres, for at kunne svare "ja" til dette trin. Hvis der kun ses en ubetydelig mængde eller et svagt "anstrøg" af brunt, er det ikke nok til at erklære et resultat for positivt. Hvis der ikke ses nogen brun kernefarvning, indberettes resultatet som ***Negativt***. Fortsæt til næste trin, hvis der ses en tilstrækkelig mængde brun farvning.

Trin 3: Er cellen med brun kernefarvning en pladecelle eller en glandulær celle?
Fortsæt til næste trin, hvis svaret er ja. Hvis svaret er nej, er testresultatet ***Negativt***.

Trin 4: Er cellen ≥ ASC (atypisk pladecelle) eller AGC (atypisk glandulær celle)?
Anvend de samme morfologiske kriterier, der er beskrevet i Bethesda-systemet til indberetning af cervikal cytologi (Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) for at afgøre, om pladecellen med den brune kerne er ≥ ASC (atypisk pladecelle). Hvis cellen betragtes som ≥ASC (eller ≥AGC) er testresultatet ***Positivt***. Dette inkluderer ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL og cancer. Hvis cellens udseende er glandulært, gælder TBS-kriterierne for bestemmelse af, om en celle er ≥ AGC (atypisk glandulær celle). Dette inkluderer endocervikal AGC, endometriel AGC, AIS og adenocarcinom. Hvis den pågældende celle er i overensstemmelse med NILM (negativ for intraepitelial læsion eller malignitet) er testresultatet ***Negativt***.

13. LITTERATUR

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. SYMBOLFORKLARING

REF	Katalognummer
IVD	Til *in vitro* diagnostisk brug
	Se brugsanvisningen
Σ	Indeholder 75 test
	Forsigtig, læs den medfølgende dokumentation
	Temperaturbegrænsninger under opbevaring
LOT	Batchnummer
	Anvendes inden ÅÅÅÅ-MM-DD eller ÅÅÅÅ-MM
	Producent

TEKNISK SUPPORT
USA
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Udviklet med teknologi fra Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ er varemærker tilhørende Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, USA
www.millennium.com

Påvisningsreagenser leveret af

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596, USA

SurePath® er et produkt og registreret varemærke tilhørende TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate er produkter og varemærker tilhørende TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SUREPATH®
with PROEX™ C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. FINALIDADE

A análise imuno-citoquímica SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test destina-se a ser utilizada para avaliação qualitativa da indução aberrante de fase S em amostras de citologia do colo do útero colhidas em SurePath® Preservative Fluid. Os resultados da análise fornecem informações adicionais para o diagnóstico citológico do colo do útero.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A proteína de manutenção de minicromossomas (MCM) desempenha um papel essencial na replicação de ADN eucariótico. Cada uma das proteínas MCM possui motivos ATPase dependentes do ADN no seu domínio central altamente conservado. Os níveis de proteínas MCM aumentam geralmente de forma variável à medida que as células normais passam da fase G0 para a fase G1/S do ciclo celular. A alfa topoisomerase II (TOP2A) é uma enzima nuclear essencial envolvida na replicação do ADN, sendo um alvo para inúmeros medicamentos anti-cancerígenos utilizados na terapêutica contra o cancro. A expressão reduzida da TOP2A constitui um mecanismo predominante de resistência a diversos agentes quimioterapêuticos. Foi observada uma variação significativa no intervalo de expressão desta proteína em diversos tipos de tumores. A TOP2A expressa-se predominantemente nas células proliferativas e é modificada na fase M através de fosforilação em locais específicos, um processo que é fundamental para a condensação e segregação do cromossoma mitótico.

O cocktail de anticorpos ProEx™ C contém anti-MCM2 monoclonal de ratinho e anti-TOP2A purificado de sobrenadante de cultura de tecidos e foi diluído numa solução salina tamponada, que contém estabilizadores de proteínas e 0,09% de azida de sódio.

3. PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O kit da análise imuno-citoquímica SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test contém um cocktail de anticorpos, reagentes de detecção e contrastante necessários para concluir um procedimento de coloração imuno-citoquímico manual ou automático composto de três passos, destinado a amostras do colo do útero de camada fina preparadas de forma rotineira. Após a incubação da amostra com o cocktail de anticorpos de ratinho patenteado, é visualizada uma ligação de anticorpo monoclonal selectiva, indicadora de uma análise positiva, utilizando um sistema exclusivo e pronto a utilizar de cromogénio de anticorpos ligados à enzima. O reagente enzimático consiste num conjugado de peroxidase de rábano e de anticorpo de cabra anti-ratinho secundário ligado à cadeia principal do polímero dextrano. A adição de uma cromogénio específico resulta na formação de um produto cromogénico visível localizado nos locais de ligação antigénio-anticorpo. A amostra é, em seguida, sujeita a contrastação com hematoxilina, é aplicado um agente de *Bluing* e a lâmina é protegida com uma lamela. Os resultados são interpretados utilizando um microscópio óptico. Obtém-se um resultado positivo, indicador de uma doença no colo do útero de alto grau, sempre que o núcleo das células em causa apresenta uma coloração castanha.

Pode criar-se uma galeria de referência de lâminas potencialmente positivas utilizando equipamento de imagiologia automático. A galeria pode ser revista para determinar um resultado positivo ou negativo.

A análise imuno-citoquímica SurePath® with ProEx™ C Immunocytochemical Test é aplicável tanto para a coloração manual, como para a automática.

4. REAGENTES FORNECIDOS

Os seguintes materiais estão incluídos e são suficientes para 75 preparações de camada fina:

Frasco Nº	Descrição	
1a	**Bloqueio de peroxidase:** Peróxido de hidrogénio tamponado acrescido de estabilizador e de componentes patenteados	2-8 °C
1b	**Bloqueio de proteínas:** Caseína purificada acrescida de combinação patenteada de proteínas no PBS modificado com conservante e surfactante	2-8 °C
2	**Cocktail de anticorpos:** Cocktail de anticorpos monoclonais, pronto a utilizar, fornecido na solução tampão TRIS com Tween 20, pH 7,4. Contém proteínas estabilizadoras e agente antimicrobiano	2-8 °C
3a	**Sonda de ratinho:** Liga-se a anticorpos monoclonais de ratinho	2-8 °C
3b	**Reagente polimérico:** Polímero conjugado com peroxidase de rábano que se liga ao reagente de sonda de ratinho	2-8 °C
4a	**Substrato Tampão de DAB**: Tampão substrato utilizado na preparação do cromogénio DAB	2-8 °C
4b	**DAB:** Solução de cromogénio de 3,3'-diaminobenzidina	2-8 °C
5	**Hematoxilina:** Hematoxilina de Mayer de base aquosa	15-30 °C
6	**Agente de Bluing:** Soro fisiológico tamponado Tris, pH 7,4 com Tween 20 e 0,09% NaN_3	15-30 °C

5. MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Toalhetes absorventes
- Linha celular SureDetect™ SiHa – REF[a] 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Água desionizada ou destilada
- Etanol (95% e 100%)
- Lamelas de vidro
- Luvas
- Câmara húmida
- Microscópio óptico (objectivas de 10x, 20x (opcional), 40x)
- Meio de montagem
- Pipetas e pontas de pipeta (com capacidade para administrar volumes de 20 µl, 200 µl e 1000 µl)
- Tampão de preparação de lâminas SureDetect™ 10X – REF[a] 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Tampão de pré-tratamento
- Frascos ou banhos de coloração
- Cronómetro (com intervalos de 1 a 60 minutos)
- Soro fisiológico tamponado Tris (TBS)
- Tween 20
- Controlo negativo de IgG de ratinho universal
- Dispositivo de vórtex
- Xilol ou substitutos de xilol
- Estufa de vapor / banho de água

6. ADVERTÊNCIAS

Xn - Nocivo	Hidrato de cloral ***Frases de risco:*** *22 Nocivo por ingestão.* ***Frases de segurança:*** *23 Não respirar os gases/fumos/vapores/aerossóis.* *25 Evitar o contacto com os olhos.* *36 Usar vestuário de protecção adequado.* *45 Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente o médico.* *60 Este produto e seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos.*
Xn - Nocivo	3,3 diaminobenzidina ***Frases de risco:*** *22 Nocivo por ingestão.* *40 Possibilidade de efeitos cancerígenos.* ***Frases de segurança:*** *23 Não respirar os gases/fumos/vapores/aerossóis.* *36/37 Usar vestuário de protecção e luvas adequadas.* *60 Este produto e seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos*

7. PRECAUÇÕES

7.1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

7.2. As lâminas SurePath® preparadas devem ser colocadas no tampão de pré-tratamento assim que acabarem de ser preparadas. As lâminas devem permanecer no tampão de pré-tratamento durante, no mínimo, 1 hora, mas não mais de 72 horas antes do procedimento de imuno-citoquímica.

7.3. Não permitir que as lâminas sequem em nenhum momento durante o procedimento. Caso se permita que as lâminas sequem durante o procedimento, tal resultará num aumento da coloração de fundo.

7.4. A 3,3'-diaminobenzidina (DAB) é classificada como um suposto carcinogénico que apresenta o potencial risco de provocar efeitos irreversíveis. Evitar o contacto físico e exposição repetida ou prolongada à mesma. É altamente recomendada a utilização de uma câmpanula de fumos químicos. Não permitir que entre em contacto com os olhos, pele ou vestuário. Lavar bem as mãos após o manuseamento. A solução de trabalho de DAB deverá ser preparada de acordo com o folheto informativo.

7.5. Alguns reagentes deste kit contêm azida de sódio (NaN_3), um produto químico altamente tóxico na forma pura. A azida de sódio pode ser fatal quando ingerida ou absorvida por via cutânea. Estes reagentes são nocivos quando inalados. Estes reagentes são sólidos perigosos. Provoca irritação na pele, nos olhos e no tracto respiratório. Afecta o sistema nervoso central, rins e sistema cardiovascular. Embora não seja classificada como perigosa em situações de concentração do produto, as acumulações de azida de sódio podem reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar o produto, adicionar água abundante para evitar a acumulação de azidas na canalização.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.

7.6. Hematoxilina e agente de *Bluing*: estes reagentes são nocivos quando ingeridos. A hematoxilina e os agentes de *Bluing* são irritantes oculares, cutâneos e respiratórios.

7.7. As amostras e todos os materiais expostos às amostras deverão ser manuseados como materiais passíveis de transmitir infecção e devem ser eliminados com as devidas precauções. Nunca pipetar os reagentes com a boca e evitar o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e as amostras. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lavar com água abundante.

7.8. Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes para evitar uma coloração não específica.

7.9. Tempos e temperaturas de incubação ou métodos diferentes dos especificados podem originar resultados erróneos.

7.10. Os reagentes foram diluídos para um desempenho ideal. Uma diluição adicional pode resultar na perda de coloração do antigénio.

7.11. Os componentes do kit são específicos do lote. Não substituir os componentes do kit por números de lotes de diferentes fabricantes. Os números dos lotes são apresentados nas etiquetas das embalagens.

7.12. Não utilizar o kit de análise SurePath® with ProEx™ C depois de expirado o prazo de validade impresso na embalagem. O utilizador deverá validar as condições reais, caso os reagentes sejam conservados noutras condições que não as especificadas no folheto informativo incluído na embalagem.

7.13. Não existem quaisquer sinais visíveis que indiquem a degradação deste produto. Por conseguinte, devem processar-se simultaneamente controlos positivos e negativos conjuntamente com as amostras das doentes. Se se observar uma coloração imprevista, que não possa ser explicada pelas variações dos procedimentos laboratoriais, ou houver suspeita de uma anomalia no kit de análise SurePath® with ProEx™ C, contactar a Assistência Técnica da TriPath Imaging.

7.14. Usar equipamento de protecção pessoal adequado para evitar o contacto do reagente com a pele e os olhos. Consultar a Ficha de Dados de Segurança do Material (MSDS) para obter informações adicionais.

7.15. A análise SurePath® with ProEx™ C destina-se a ser utilizada em amostras de citologia do colo do útero colhidas em SurePath® Preservative Fluid. A compatibilidade com preparações convencionais e de uma única camada que não as da SurePath® ainda não foi avaliada.

8. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

8.1. Preparação das amostras

8.1.1. Consultar o Manual do Utilizador do SurePath® PrepStain System para obter as instruções para a preparação de lâminas provenientes de amostras residuais de citologia do colo do útero SurePath®.

8.1.2. Adicionar 8 mL de SurePath® Preservative Fluid à amostra residual no frasco SurePath® (aprox. 2 mL). A amostra diluída deverá ser processada no BD PrepMate™ utilizando a técnica padrão e no PrepStain.

8.1.3. As amostras SurePath® preparadas devem ser colocadas no tampão de preparação de lâminas SureDetect™ assim que acabarem de ser preparadas (consultar a secção "Tampão de preparação de lâminas 10X SureDetect™" para obter instruções sobre a preparação de uma solução de trabalho para as lâminas). As lâminas devem permanecer no tampão durante, no mínimo, 1 hora, mas não mais de 72 horas antes do procedimento de imuno-citoquímica.

8.1.4. Para um desempenho ideal do kit, deve utilizar-se um procedimento de recuperação do epítopo. Este procedimento envolve submergir as lâminas preparadas numa solução de trabalho do tampão de preparação de lâminas SureDetect™ durante um período mínimo de 1 hora à temperatura ambiente, após o qual se aquecem as lâminas no tampão de pré-tratamento a uma temperatura de 95 °C. As lâminas são mantidas a uma temperatura de 95 °C durante 15 minutos e devem ser deixadas arrefecer à temperatura ambiente durante 20 minutos. Recomenda-se a utilização de um banho de água calibrado ou de uma estufa de vapor capaz de manter a temperatura necessária. Os laboratórios situados em locais mais elevados deverão determinar o melhor método de manter a temperatura necessária. O procedimento de coloração deverá ser iniciado imediatamente após a recuperação do epítopo e período de arrefecimento. Os desvios ao procedimento descrito podem afectar adversamente os resultados.

8.2. Preparação dos reagentes

8.2.1. Preparar os seguintes reagentes antes de proceder à coloração.

8.2.2. Soro fisiológico tamponado Tris com 0,05% de Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. Preparar o TBS de acordo com as especificações do fabricante.

8.2.2.2. Caso ainda não esteja incluído no TBS, adicionar Tween 20 para obter uma concentração final de 0,05%.

8.2.3. Solução substrato-cromogénio (DAB) (volume suficiente para 5 lâminas)

8.2.3.1. Transferir 1 mL de tampão substrato de DAB (frasco 4a) para um tubo de ensaio.

8.2.3.2. Adicionar uma gota (20 – 30 µL) de cromogénio DAB (frasco 4b). Homogeneizar bem e aplicar nas lâminas com uma pipeta.

8.2.3.3. Preparar diariamente uma nova solução de substrato-cromogénio.

8.2.3.4. A qualidade da coloração não é afectada pelo precipitado que pode desenvolver-se na solução.

9. PROTOCOLO DE COLORAÇÃO (Efectuado à temperatura ambiente, a 20-25 °C).

9.1. Notas ao procedimento de coloração

9.1.1. Ler atentamente todas as instruções e familiarizar-se com todos os componentes antes da respectiva utilização (ver Precauções).

9.1.2. Antes da imunocoloração, todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).

9.1.3. Todas as incubações devem ser efectuadas à temperatura ambiente, salvo indicação em contrário.

9.1.4. Durante o procedimento de coloração, não permitir a secagem das lâminas. As preparações celulares secas poderão apresentar um aumento da coloração não específica. Proteger as lâminas que possam ser expostas a correntes de ar. As lâminas devem ser colocadas numa câmara húmida para incubações prolongadas.

9.2. Recuperação do epítopo

9.2.1. Colocar as lâminas preparadas num frasco Coplin contendo uma solução de trabalho de tampão de preparação de lâminas SureDetect™ durante um período mínimo de 1 hora, até um máximo de 72 horas.

9.2.2. Incubar num banho de água ou estufa de vapor durante 15 minutos a uma temperatura de 95 °C.

9.2.3. Retirar o frasco Coplin com as lâminas do banho de água ou da estufa de vapor e deixar as lâminas arrefecerem no tampão durante 20 minutos.

9.2.4. Lavar as lâminas com H_2O desionizada e transferir para um frasco Coplin limpo que contenha TBST.

9.3. Reagente de bloqueio

9.3.1. Remover o tampão em excesso com pequenas pancadas.

9.3.2. Colocar as lâminas numa câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.3.3. Aplicar 200 µL de reagente de bloqueio de peroxidase (frasco 1a) de modo a cobrir a área de deposição de células.

9.3.4. Incubar durante 5 minutos (±1 minuto).

9.3.5. Lavar as lâminas em TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.

9.4. Bloqueio de proteínas

9.4.1. Remover o tampão em excesso com pequenas pancadas.

9.4.2. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.4.3. Aplicar 200 µL de bloqueio de proteínas (frasco 1b) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.

9.4.4. Incubar durante 5 minutos (±1 minuto).

9.4.5. NÃO LAVAR.

9.5. Cocktail de anticorpos primário

9.5.1. Remover o bloqueio de proteínas em excesso com pequenas pancadas.

9.5.2. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.5.3. Aplicar 200 µL de ProEx™ C Ab Cocktail (frasco 2) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.

9.5.4. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.

9.5.5. Lavar cada lâmina individualmente com TBST utilizando um frasco de lavagem (não incidir o fluxo directamente sobre a área de deposição de células). Colocar as lâminas num suporte de lâminas.

9.5.6. Lavar as lâminas em TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.

9.6. Química de detecção

9.6.1. Remover o tampão em excesso com pequenas pancadas.

9.6.2. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.6.3. Aplicar 200 µL de reagente de sonda de ratinho (frasco 3a) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.

9.6.4. Incubar durante 20 minutos (±1 minuto).

9.6.5. Lavar as lâminas em TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.

9.6.6. Remover o tampão em excesso com pequenas pancadas.

9.6.7. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.6.8. Aplicar 200 µL de reagente polimérico (frasco 3b) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.

9.6.9. Incubar durante 20 minutos (±1 minuto).

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.6.10. Lavar as lâminas num banho de TBST, 3 banhos, 2 minutos cada.

9.6.11. Remover o tampão em excesso com pequenas pancadas.

9.6.12. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.6.13. Aplicar 200 µL de solução de substrato-cromogénio (DAB) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.

9.6.14. Incubar durante 5 minutos (±1 minuto).

9.6.15. Lavar as lâminas com H_2O desionizada durante 5 minutos.

9.7. Contrastante

9.7.1. Lavar as lâminas em TBST, 1 banho durante 2 minutos.

9.7.2. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.7.3. Aplicar 200 µL de contrastante Hematoxilina (frasco 5) de modo a cobrir completamente a área de deposição de células.

9.7.4. Incubar durante 1 minuto (±10 segundos).

9.7.5. Lavar as lâminas com H_2O corrente durante 3 minutos.

9.7.6. Colocar as lâminas na câmara húmida preparada (cheia de gazes ou folhas de papel absorvente embebidas em água).

9.7.7. Submeter as lâminas ao procedimento de *Bluing* aplicando nas mesmas 200 µL de agente de *Bluing* (frasco 6) durante 1 minuto (±10 segundos).

9.7.8. Repetir a lavagem em água corrente durante 1 minuto.

9.8. Montagem

9.8.1. Imergir as lâminas em etanol a 95%, durante 1 minuto ou 25 vezes.

9.8.2. Imergir as lâminas em álcool absoluto, 4 banhos, 1 minuto cada ou 25 vezes.

9.8.3. Limpar com xilol, 3 banhos, 1 minuto cada ou 25 imersões.

9.8.4. Cobrir com meios de montagem permanentes não aquosos, utilizando lamelas de vidro.

10. ESTABILIDADE

10.1. Quando conservados às temperaturas recomendadas, os frascos de reagente fechados permanecem estáveis até à data indicada no frasco.

10.2. Uma vez aberto o frasco, os reagentes permanecem estáveis durante trinta dias quando conservados às temperaturas recomendadas.

11. CONTROLO DE QUALIDADE

11.1. A variabilidade nos resultados deriva frequentemente de diferenças no manuseamento das amostras, que se desviam dos procedimentos de teste recomendados. Consultar as directrizes de controlo de qualidade do Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*, para obter mais informações.

11.2. O controlo celular SureDetect™ SiHa encontra-se disponível como um controlo positivo da TriPath Imaging, Inc. Cada frasco contém uma linha celular do cancro do colo do útero, que é processada da mesma forma que as amostras clínicas. Como controlo negativo, pode utilizar-se o controlo universal negativo de IgG de ratinho. Em cada procedimento de coloração deverá ser incluída uma lâmina de controlo positivo e negativo. Os resultados da coloração deverão ser utilizados como indicação da validade do processo de coloração.

12. INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO

12.1. Amostras de doentes e de controlo: Um técnico de citologia ou um patologista deverá avaliar as lâminas coradas utilizando um microscópio óptico. As células podem ser revistas manualmente ou memorizadas numa galeria de imagens electrónicas obtidas a partir de um microscópio óptico.

12.2. Lâminas de controlo: As lâminas de controlo positivo e negativo deverão ser examinadas antes da respectiva revisão das amostras das doentes, de modo a assegurar que todos os reagentes funcionaram devidamente. A presença de um produto de reacção castanha (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto, DAB) no núcleo de uma lâmina de controlo celular SiHa, corada por meio da análise SurePath® with ProEx™, é indicadora de reactividade positiva. A lâmina de controlo negativo universal de IgG de ratinho, corada por meio da análise SurePath® with ProEx™ C, não deve apresentar quaisquer núcleos de coloração castanha e só deverá apresentar coloração com a aplicação do contrastante hematoxilina.

12.3. A classificação das lâminas é um processo composto por 4 passos.

Passo 1: A amostra é adequada?
O *Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology* (Relatórios de diagnóstico citológico do colo do útero) (2ª Ed.) refere: "Uma adequada preparação de base líquida deverá evidenciar um valor mínimo previsto de, pelo menos, 5000 células escamosas bem visualizadas / bem conservadas". O mesmo critério deverá ser aplicado às lâminas SurePath® with ProEx™ C. Todavia, tal como sucede com uma preparação citológica de rotina, qualquer amostra com células anormais que evidencie uma reacção molecular positiva é, por definição, satisfatória para avaliação. Se a resposta a este passo for "sim", prosseguir para o próximo passo; se a resposta for "não", o resultado é ***Insatisfatório para avaliação***.

Passo 2: Verifica-se uma coloração nuclear castanha moderada a intensa nas células epiteliais?
Para responder "sim" a este passo, é necessário verificar se existe alguma coloração castanha que seja facilmente visualizada. Se for detectado apenas um ligeiro vestígio de castanho, isto não é suficiente para garantir uma classificação de positivo. Se não se detectar nenhuma coloração nuclear castanha, o resultado é relatado como ***Negativo***. Se for visualizada uma coloração castanha adequada, prosseguir para o próximo passo.

Passo 3: A célula com uma coloração nuclear castanha é uma célula escamosa ou glandular?
Se a resposta for sim, prosseguir para o próximo passo. Se a resposta for não, tal constitui um resultado de análise ***Negativo***.

Passo 4: A célula é ≥ ASC (célula escamosa atípica) ou AGC (célula glandular atípica)?
Utilizar os mesmos critérios morfológicos descritos em *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology* (2ª Ed.) para determinar se a célula escamosa que contém o núcleo castanho é ≥ ASC (células escamosas atípicas). Se a célula for considerada ≥ASC (ou ≥AGC), isso significa que o resultado da análise é ***Positivo***. Isto inclui células ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e cancerígenas. Se a célula for glandular em termos de aspecto, aplicam-se os critérios TBS para determinar se a célula é ≥ AGC (células glandulares atípicas). Isto inclui AGC endocervical, AGC endometrial, AIS e adenocarcinoma. Se a célula em questão for consistente com um caso de NILM (negativo quanto a lesão ou malignidade intraepitelial), o resultado da análise é ***Negativo***.

13. BIBLIOGRAFIA

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo
IVD	Para utilização em diagnóstico *in vitro*
	Consultar as instruções de utilização
Σ	Contém 75 testes
	Cuidado, consultar a documentação fornecida
	Limitações da temperatura de conservação
LOT	Código do lote
	Utilizar até AAAA-MM-DD ou AAAA-MM
	Fabricante

SUPORTE TÉCNICO

EUA
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

Desenvolvido com tecnologia da Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ são marcas comerciais da Millennium Pharmaceuticals, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Reagentes de Detecção fornecidos por

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® é um produto e marca comercial registada da TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate são produtos e marcas comerciais da TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η ανοσοκυτταροχημική εξέταση SurePath® με ProEx™ C προορίζεται για την ποιοτική αξιολόγηση της ελαττωματικής επαγωγής κατά τη φάση S σε δείγματα τραχηλικής κυτταρολογίας που συλλέγονται σε υγρό διατήρησης SurePath®. Τα αποτελέσματα της εξέτασης παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για διαγνώσεις τραχηλικής κυτταρολογίας.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες συντήρησης μικροσκοπικών χρωμοσωμάτων (MCM) παίζουν έναν κεντρικό ρόλο στον διπλασιασμό του ευκαρυωτικού DNA. Καθεμιά από τις πρωτεΐνες MCM έχει μοτίβα ATPάσης εξαρτώμενα από DNA στην υψηλώς συντηρητική κεντρική περιοχή της. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών MCM γενικώς αυξάνονται με μεταβλητό τρόπο καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα προχωρούν από την φάση G0 στη φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου. Η τοποϊσομεράση ΙΙ άλφα (TOP2A) είναι ένα απαραίτητο πυρηνικό ένζυμο που εμπλέκεται στο διπλασιασμό του DNA και αποτελεί στόχο για πολλά αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία κατά του καρκίνου. Η μειωμένη έκφραση της TOP2A είναι ένας κυρίαρχος μηχανισμός αντίστασης σε διάφορους θεραπευτικούς παράγοντες. Μια σημαντική παραλλαγή στο φάσμα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής παρατηρήθηκε σε πολλούς και διαφορετικούς όγκους. Η TOP2A επικρατεί στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και τροποποιείται στην φάση Μ από φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένες θέσεις, ένα κρίσιμο γεγονός για τη συμπύκνωση και διαχωρισμό των μιτωτικών χρωμοσωμάτων.

Το κοκτέιλ αντισωμάτων ProEx™ C περιέχει μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι των MCM2 και TOP2A, τα οποία έχουν απομονωθεί από υπερκείμενη ιστοκαλλιέργεια και είναι αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού με σταθεροποιητές πρωτεϊνών και νατραζίδιο 0,09%.

3. ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το κιτ της ανοσοκυτταροχημικής εξέτασης SurePath® με ProEx™ C περιέχει ένα κοκτέιλ αντισωμάτων, αντιδραστήρια ανίχνευσης και αντίχρωσης απαραίτητα για την ολοκλήρωση μιας διαδικασίας τριών βημάτων χειροκίνητης ή αυτοματοποιημένης ανοσοκυτταροχημικής χρώσης για τα συνήθως παρασκευαζόμενα τραχηλικά δείγματα λεπτής στιβάδας. Μετά την επώαση του δείγματος με ένα ιδιοκτησιακού καθεστώτος κοκτέιλ αντισωμάτων ποντικού, επιλεκτικής δέσμευσης μονοκλωνικού αντισώματος, ενδεικτικού θετικής εξέτασης, η εποπτική παρουσίαση περιλαμβάνει ένα μοναδικό σύστημα έτοιμου προς χρήση αντισώματος ενωμένου με ένζυμο και χρωμογόνο. Το ενζυμικό αντιδραστήριο είναι ένα δευτεροταγές αντίσωμα αίγας έναντι ποντικού, σύμπλοκο υπεροξειδάσης από ραφανίδα, που συνδέεται με μια αλυσίδα πολυμερούς δεξτράνης. Προσθήκη ενός ειδικού χρωμογόνου προκαλεί το σχηματισμό ενός ορατού χρωμογόνου προϊόντος που εντοπίζεται στις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια το δείγμα αντιχρωματίζεται με αιματοξυλίνη, εφαρμόζεται ένας παράγοντας μπλε χρώσης και στην αντικειμενοφόρο τοποθετείται καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο. Θετικό αποτέλεσμα, ενδεικτικό υψηλού βαθμού τραχηλικής νόσου, επιπυγχάνεται όταν οι πυρήνες στα κύτταρα υπό εξέταση χρωματιστούν με καφέ χρώμα.

Μια βιβλιοθήκη αναφοράς για δυνητικά θετικές αντικειμενοφόρους μπορεί να δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένο εξοπλισμό απεικόνισης. Η βιβλιοθήκη κατόπιν μπορεί να εξεταστεί για να προσδιοριστεί ένα θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα.

Η ανοσοκυτταροχημική εξέταση SurePath® with ProEx™ C εφαρμόζεται τόσο στη χειροκίνητη όσο και στην αυτοματοποιημένη χρώση.

4. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Περιλαμβάνονται τα παρακάτω υλικά, τα οποία επαρκούν για 75 παρασκευάσματα λεπτής στιβάδας.

Αρ. φιαλιδίου	Περιγραφή	
1a	**Αποκλεισμός υπεροξειδάσης:** Ρυθμιστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου συν σταθεροποιητής και ιδιοκτησιακά συστατικά	2-8°C
1b	**Αποκλεισμός πρωτεϊνών:** Καθαρή πρωτεΐνη συν ιδιοκτησιακός συνδυασμός πρωτεϊνών σε τροποποιημένο PBS με συντηρητικό και τασιενεργό	2-8°C
2	**Κοκτέιλ αντισωμάτων:** Έτοιμο προς χρήση κοκτέιλ μονοκλωνικών αντισωμάτων που παρέχεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με Tween 20, και pH 7,4. Περιέχει σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και αντιμικροβιακό παράγοντα.	2-8°C
3a	**Ιχνηλάτη ποντικού:** Δεσμεύεται στα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού	2-8°C
3b	**Αντιδραστήριο πολυμερούς:** Πολυμερές συζυγές με υπεροξειδάση αγριοραπανιού που δεσμεύεται στο αντιδραστήριο-ιχνηλάτη ποντικού	2-8°C
4a	**Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος DAB:** Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του χρωμογόνου DAB	2-8°C
4b	**DAB:** Διάλυμα χρωμογόνου 3,3'-διαμινοβενζιδίνης	2-8°C
5	**Αιματοξυλίνη:** Υδατική αιματοξυλίνη του Mayer	15-30°C
6	**Ουσία μπλε χρώσης:** Τρις ρυθμιστικό φυσιολογικό διάλυμα, pH 7.4 με Tween 20 και 0,09% NaN_3	15-30°C

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΡΟΜΗΘΕΥΟΝΤΑΙ

- Μαντηλάκια καθαρισμού
- SureDetect™ SiHa Cell Line – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Αιθανόλη (95% και 100%)
- Γυάλινες καλυπτρίδες
- Γάντια
- Υγρός θάλαμος
- Οπτικό μικροσκόπιο (αντικειμενικούς φακούς 10x, 20x [προαιρετικά], 40x)
- Μέσο κάλυψης
- Πιπέτες και ρύγχη πιπετών (ικανές να μεταφέρουν όγκους 20μL, 200μL και 1000μL)
- Ρυθμιστικό διάλυμα προετοιμασίας αντικειμενοφόρων SureDetect™ 10X – ΑΝΑΦ. 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Ρυθμιστικό διάλυμα προκατεργασίας
- Δοχεία ή λουτρά χρώσης
- Χρονόμετρο (με δυνατότητα διαστημάτων 1-60 λεπτά)
- Τρις ρυθμιστικός φυσιολογικός ορός (TBS)
- Tween 20
- Αρνητικός μάρτυρας IgG ποντικού γενικής χρήσεως
- Συσκευή περιδίνησης
- Ξυλένιο ή υποκατάστατα ξυλενίου
- Ατμόλουτρο/υδατόλουτρο

6. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Xn - Επιβλαβές	Ένυδρος χλωράλη ***Φράσεις κινδύνου:*** *22 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.* ***Φράσεις ασφαλείας:*** *23 Μην αναπνέετε αέρια/καπνούς/αναθυμιάσεις/εκνεφώματα.* *25 Αποφύγετε την επαφή με τα μάτια.* *36 Να φοράτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία.* *45 Σε περίπτωση ατυχήματος ή εάν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή.* *60 Το υλικό και ο περιέκτης του να θεωρηθούν κατά τη διάθεσή τους επικίνδυνα απόβλητα.*
Xn - Επιβλαβές	3,3, διαμινοβενζιδίνη ***Φράσεις κινδύνου:*** *22 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.* *40 Ύποπτο καρκινογένεσης.* ***Φράσεις ασφαλείας:*** *23 Μην αναπνέετε αέρια/καπνούς/αναθυμιάσεις/εκνεφώματα.* *36/37 Χρησιμοποιείτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία/κατάλληλα προστατευτικά γάντια.* *60 Το υλικό και ο περιέκτης του να θεωρηθούν κατά τη διάθεσή τους επικίνδυνα απόβλητα*

7. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

7.1. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

7.2. Οι παρασκευασμένες αντικειμενοφόροι SurePath® πρέπει να τοποθετούνται στο ρυθμιστικό διάλυμα προκατεργασίας αμέσως μόλις παρασκευαστούν. Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να παραμένουν στο ρυθμιστικό διάλυμα προκατεργασίας επί τουλάχιστον 1 ώρα, αλλά όχι περισσότερο από 72 ώρες πριν από την ανοσοκυτταροχημεία.

7.3. Μην επιτρέψετε να στεγνώσουν οι αντικειμενοφόροι οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Οι αντικειμενοφόροι που αφέθηκαν να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη χρώση του υπόβαθρου.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.4. Η 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB) κατατάσσεται ως ύποπτο καρκινογόνο με το δυνητικό κίνδυνο παραγωγής μη αναστρέψιμων αποτελεσμάτων. Αποφεύγετε τη σωματική επαφή και την παρατεταμένη ή επανειλημμένη έκθεση. Συνιστάται θερμώς απαγωγός αναθυμιάσεων. Αποφύγετε την επαφή με τα μάτια, το δέρμα ή τα ρούχα. Πλύνετε τα χέρια επιμελώς μετά το χειρισμό. Το διάλυμα εργασίας DAB πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με το ένθετο συσκευασίας.

7.5. Μερικά αντιδραστήρια σε αυτό το κιτ περιέχουν νατραζίδιο (NaN_3), μια εξαιρετικά τοξική χημική ένωση σε καθαρή μορφή. Το νατραζίδιο μπορεί να είναι μοιραίο κατά την κατάποση ή απορρόφηση από το δέρμα. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι επικίνδυνα κατά την εισπνοή. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι επικίνδυνα στερεά. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος, των ματιών και της αναπνευστικής οδού. Επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα, τους νεφρούς και το καρδιαγγειακό σύστημα. Αν και δεν κατατάσσεται ως επικίνδυνο στις συγκεντρώσεις του προϊόντος, οι συσσωρεύσεις νατραζιδίου πιθανόν να αντιδράσουν με τις μολύβδινες και χάλκινες σωληνώσεις σχηματίζοντας πολύ εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Όταν το απορρίπτετε, ξεπλένετε με μεγάλες ποσότητες νερού ώστε να προλάβετε το σχηματισμό μεταλλικών αζιδίων στις σωληνώσεις.

7.6. Αιματοξυλίνη και παράγοντας μπλε χρώσης. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι επικίνδυνα εάν καταποθούν. Η αιματοξυλίνη και οι παράγοντες μπλε χρώσης προκαλούν ερεθισμό των ματιών, του δέρματος και του αναπνευστικού.

7.7. Πρέπει να χειρίζεστε τα δείγματα και όλα τα υλικά που εκτίθενται στα δείγματα ως πιθανά λοιμογόνα και να τα απορρίπτετε με τις κατάλληλες προφυλάξεις. Ποτέ μην αναρροφάτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή τους με το δέρμα και τις βλεννογόνους μεμβράνες. Εάν τα αντιδραστήρια έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.

7.8. Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή επιμόλυνση των αντιδραστηρίων για την αποφυγή της μη ειδικής χρώσης.

7.9. Χρόνοι επώασης, θερμοκρασίες και μέθοδοι διαφορετικοί από εκείνους που έχουν καθοριστεί μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

7.10. Τα αντιδραστήρια έχουν αραιωθεί για βέλτιστη απόδοση. Περαιτέρω αραίωση πιθανόν να προκαλέσει απώλεια χρώσης του αντιγόνου.

7.11. Τα συστατικά του κιτ εξαρτώνται από την παρτίδα. Μην αντικαθιστάτε τα συστατικά του κιτ με άλλα με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδων παραγωγής. Οι αριθμοί παρτίδων υπάρχουν στις ετικέτες συσκευασίας.

7.12. Μην χρησιμοποιείτε το κιτ δοκιμασίας SurePath® with ProEx™ C μετά την ημερομηνία λήξης που είναι τυπωμένη στη συσκευασία. Ο χρήστης πρέπει να κάνει επαλήθευση των συνθηκών στις περιπτώσεις που τα αντιδραστήρια φυλάσσονται υπό συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που καθορίζει το ένθετο της συσκευασίας.

7.13. Δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια που να δείχνουν υποβάθμιση του προϊόντος αυτού. Επομένως, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να διεξάγονται ταυτόχρονα με τα δείγματα ασθενούς. Αν παρατηρηθεί μη αναμενόμενη χρώση, η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί από διαφορές στις εργαστηριακές διαδικασίες ή υπάρχει υποψία για πρόβλημα με το κιτ εξετάσεων SurePath® με ProEx™ C, επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη της TriPath Imaging.

7.14. Να φοράτε τα κατάλληλα Μέσα Ατομικής Προστασίας για να αποφύγετε την επαφή του αντιδραστηρίου με τα μάτια και το δέρμα. Για περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στο Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας Υλικού (MSDS).

7.15. Η εξέταση SurePath® με ProEx™ C προορίζεται για χρήση σε δείγματα τραχηλικής κυτταρολογίας που συλλέγονται σε υγρό διατήρησης SurePath®. Δεν έχει αξιολογηθεί η συμβατότητα με συμβατικά και μονοστιβαδικά παρασκευάσματα εκτός του SurePath®.

8. ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

8.1. Προετοιμασία του δείγματος

8.1.1. Συμβουλευθείτε το Εγχειρίδιο χειριστή του SurePath® PrepStain System για οδηγίες σχετικά με την προετοιμασιά των αντικειμενοφόρων πλακών από δείγματα τραχηλικής κυτταρολογίας SurePath®.

8.1.2. Προσθέστε 8mL υγρού διατήρησης SurePath® στο υπολειμματικό δείγμα στο φιαλίδιο SurePath® (2 mL περίπου). Το αραιωμένο δείγμα πρέπει να υποβληθεί σε κατεργασία στο BD PrepMate™ χρησιμοποιώντας την πρότυπη τεχνική και στο PrepStain.

8.1.3. Οι παρασκευασμένες αντικειμενοφόρες πλάκες SurePath® πρέπει να τοποθετούνται στο ρυθμιστικό διάλυμα προετοιμασίας αντικειμενοφόρων SureDetect™ αμέσως μόλις παρασκευαστούν (ανατρέξτε στο ρυθμιστικό διάλυμα προετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών SureDetect™ 10X για οδηγίες σχετικά με την προετοιμασία διαλύματος εργασίας αντικειμενοφόρων πλακών). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να παραμένουν στο ρυθμιστικό διάλυμα επί τουλάχιστον 1 ώρα, αλλά όχι περισσότερο από 72 ώρες πριν από την ανοσοκυτταροχημεία.

8.1.4. Μια διαδικασία ανάκτησης επιτόπων πρέπει να χρησιμοποιείται για βέλτιστη απόδοση του κιτ. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διάβρεξη των προετοιμασμένων αντικειμενοφόρων πλακών σε ένα διάλυμα εργασίας ρυθμιστικού διαλύματος προετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών SureDetect™ επί τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν θέρμανση των αντικειμενοφόρων πλακών σε ρυθμιστικό διάλυμα προκατεργασίας σε θερμοκρασία 95°C. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες διατηρούνται σε θερμοκρασία 95°C επί 15 λεπτά και κατόπιν αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου επί 20 λεπτά. Συνιστάται η χρήση βαθμονομημένου υδατόλουτρου ή φυτικού ατμόλουτρου ικανού να διατηρεί την απαιτούμενη θερμοκρασία. Εργαστήρια που βρίσκονται σε μεγαλύτερα υψόμετρα πρέπει να προσδιορίζουν την καλύτερη μέθοδο διατήρησης της απαιτούμενης θερμοκρασίας. Η διαδικασία χρώσης πρέπει να αρχίζει αμέσως μετά την ανάκτηση επιτόπου και την ψύξη. Παρεκκλίσεις από την περιγραφόμενη διαδικασία πιθανόν να επηρεάσουν δυσμενώς τα αποτελέσματα.

8.2. Προετοιμασία του αντιδραστηρίου

8.2.1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια πριν από τη χρώση.

8.2.2. Τρις ρυθμιστικός φυσιολογικός ορός με Tween 20 0,05% (TBST)

8.2.2.1. Προετοιμάστε το TBS σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή.

8.2.2.2. Αν δεν υπάρχει ήδη στο TBS, προσθέστε Tween 20 έως τελικής συγκεντρώσεως 0,05%.

8.2.3. Διάλυμα υποστρώματος-χρωμογόνου (DAB) (επαρκής όγκος για 5 αντικειμενοφόρες πλάκες)

8.2.3.1. Μεταφέρετε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος DAB (φιαλίδιο 4a) σε δοκιμαστικό σωλήνα.

8.2.3.2. Προσθέστε μια σταγόνα (20 – 30μL) χρωμογόνου DAB (φιαλίδιο 4b). Αναμίξτε επιμελώς και απλώστε στις αντικειμενοφόρους πλάκες με πιπέτα.

8.2.3.3. Προετοιμάστε νωπό διάλυμα υποστρώματος-χρωμογόνου καθημερινά.

8.2.3.4. Η ποιότητα της χρώσης δεν επηρεάζεται από το ίζημα που πιθανόν να αναπτυχθεί στο διάλυμα.

9. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΧΡΩΣΗΣ (ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ, 20-25°C)

9.1. Διαδικαστικές σημειώσεις χρώσης

9.1.1. Διαβάστε όλες αυτές τις οδηγίες προσεκτικά και εξοικειωθείτε με όλα τα συστατικά πριν από τη χρήση (βλ. Προφυλάξεις).

9.1.2. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αφήνονται να ισορροπούν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν την ανοσοχρώση.

9.1.3. Όλες οι επωάσεις πρέπει να πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός εάν σημειώνεται διαφορετικά.

9.1.4. Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρώσης. Τα κυτταρικά παρασκευάσματα που έχουν στεγνώσει ενδέχεται να εμφανίζουν αυξημένη μη ειδική χρώση. Προστατέψτε τις αντικειμενοφόρους πλάκες που πιθανόν να εκτίθενται σε ρεύματα αέρα. Στις παρατεταμένες επωάσεις, οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να τοποθετούνται σε θάλαμο ύγρανσης.

9.2. Ανάκτηση επιτόπου

9.2.1. Τοποθετήστε τις προετοιμασμένες αντικειμενοφόρους σε δοχείο coplin που περιέχει διάλυμα εργασίας ρυθμιστικού διαλύματος προετοιμασίας αντικειμενοφόρων πλακών SureDetect™ επί τουλάχιστον 1 ώρα έως και 72 ώρες κατά μέγιστο.

9.2.2. Επωάστε σε υδατόλουτρο ή ατμόλουτρο επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία 95°C.

9.2.3. Αφαιρέστε ολόκληρο το δοχείο coplin με τις αντκειμενοφόρους πλάκες από το υδατόλουτρο ή ατμόλουτρο και επιτρέψτε στις αντικειμενοφόρους να ψυχθούν στο ρυθμιστικό διάλυμα επί 20 λεπτά.

9.2.4. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με απιονισμένο H_2O και μεταφέρετε σε ένα καθαρό δοχείο τύπου coplin που περιέχει TBST.

9.3. Αντιδραστήριο ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ

9.3.1. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος.

9.3.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.3.3. Απλώστε 200μL αντιδραστηρίου αποκλεισμού υπεροξειδάσης (φιαλίδιο 1a) για να καλύψετε τη περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.3.4. Επωάστε επί 5 λεπτά (±1 λεπτό).

9.3.5. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε TBST, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.4. Αποκλεισμός πρωτεϊνών

9.4.1. Χτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος.

9.4.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.4.3. Απλώστε 200μL αντιδραστηρίου αποκλεισμού πρωτεϊνών (φιαλίδιο 1b) για να καλύψετε τη περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.4.4. Επωάστε επί 5 λεπτά (±1 λεπτό).

9.4.5. ΜΗΝ ΞΕΠΛΥΝΕΤΕ.

9.5. ΚΟΚΤΕΙΛ πρωτοταγών ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

9.5.1. Χτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια αποκλεισμού πρωτεϊνών.

9.5.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.5.3. Απλώστε 200μL κοκτέιλ αντισωμάτων ProEx™ C Ab (φιαλίδιο 2) για να καλύψετε εντελώς την περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.5.4. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

9.5.5. Ξεπλύνετε ανεξάρτητα κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα με TBST με έναν υδροβολέα (μην επικεντρώνετε τη ροή απευθείας επάνω στην τομή του ιστού). Φορτώστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε ένα στατήρα αντικειμενοφόρων.

8.3.1. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με TBST, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.

9.6. Χημεία ανίχνευσης

9.6.1. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος.

9.6.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.6.3. Απλώστε 200μL αντιδραστηρίου ιχνηλάτη ποντικού (φιαλίδιο 3a) για να καλύψετε εντελώς την περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.6.4. Επωάστε επί 20 λεπτά (±1 λεπτό).

9.6.5. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με TBST, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.

9.6.6. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος.

9.6.7. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.6.8. Απλώστε 200μL αντιδραστηρίου πολυμερούς (φιαλίδιο 3b) για να καλύψετε την περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.6.9. Επωάστε επί 20 λεπτά (±1 λεπτό).

9.6.10. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε λουτρό TBST, 3 αλλαγές, 2 λεπτά έκαστη.

9.6.11. Κτυπήστε ελαφρά για να απομακρύνετε την περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος.

9.6.12. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.6.13. Απλώστε 200μL διαλύματος υποστρώματος-χρωμογόνου (DAB) για να καλύψετε εντελώς την περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.6.14. Επωάστε επί 5 λεπτά (±1 λεπτό).

9.6.15. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες επί 5 λεπτά σε απιονισμένο H_2O.

9.7. Αντίχρωση

9.7.1. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με TBST, 1 αλλαγή, 2 λεπτά.

9.7.2. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.7.3. Απλώστε 200μL αντιδραστηρίου αντίχρωσης αιματοξυλίνης (φιαλίδιο 5) για να καλύψετε εντελώς την περιοχή εναπόθεσης των κυττάρων.

9.7.4. Επωάστε επί 1 λεπτό (±10 δευτερόλεπτα).

9.7.5. Ξεπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες επί 3 λεπτά σε τρεχούμενο H_2O.

9.7.6. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχετε ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες ή γάζες εμποτισμένες με νερό).

9.7.7. Δώστε μπλε χρώμα στις αντικειμενοφόρους πλάκες απλώνοντας 200μL ουσία μπλε χρώσης.Ουσία μπλε χρώσης L (φιαλίδιο 6) επί 1 λεπτό (±10 δευτερόλεπτα).

9.7.8. Επαναλάβετε το ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό επί 1 λεπτό.

9.8. Κάλυψη

9.8.1. Εμβαπτίστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε αιθανόλη 95%, 1 λεπτό ή 25 εμβαπτίσεις.

9.8.2. Εμβαπτίστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε απόλυτη αλκοόλη, 4 αλλαγές, 1 λεπτό έκαστη ή 25 εμβαπτίσεις.

9.8.3. Διαυγάστε με ξυλένιο, 3 αλλαγές, 1 λεπτό έκαστη ή 25 εμβαπτίσεις.

9.8.4. Καλύψτε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με μη υδατικό και μόνιμο υλικό κάλυψης χρησιμοποιώντας γυάλινες καλυπτρίδες.

10. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

10.1. Όταν τα φιαλίδια αντιδραστηρίων που δεν έχουν ανοιχτεί φυλάσσονται στις προτεινόμενες θερμοκρασίες παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

10.2. Μόλις ανοιχθούν τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά επί τριάντα (30) ημέρες όταν φυλάσσονται στις προτεινόμενες θερμοκρασίες.

11. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

11.1. Η μεταβλητότητα στα αποτελέσματα συχνά προέρχεται από διαφορές στον χειρισμό των δειγμάτων, η οποία αποκλίνει από τις προτεινόμενες διαδικασίες της δοκιμασίας. Συμβουλευθείτε τις προτεινόμενες οδηγίες ποιοτικού ελέγχου του Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry* για πρόσθετες πληροφορίες.

11.2. Ο κυτταρικός μάρτυρας SureDetect™ SiHa διατίθεται ως θετικός μάρτυρας από την TriPath Imaging, Inc. Κάθε φιαλίδιο περιέχει μια κυτταρική σειρά καρκίνου του τραχήλου, η οποία υποβάλλεται στην ίδια επεξεργασία όπως και τα κλινικά δείγματα. Αρνητικός μάρτυρας IgG ποντικού γενικής χρήσεως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας. Μια αντικειμενοφόρος πλάκα θετικού και αρνητικού μάρτυρα πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε διαδικασία χρώσης. Τα αποτελέσματα της χρώσης πρέπει να χρησιμοποιούνται ως ένδειξη για την εγκυρότητα της διεξαγωγής της χρώσης.

12. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

12.1. Δείγματα ασθενούς και μάρτυρες: Οι χρωματισμένες αντικειμενοφόροι πλάκες πρέπει να αξιολογηθούν από ειδικό κυταρολόγο ή παθολογοανατόμο χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο. Τα κύτταρα μπορούν να εξετασθούν χειροκίνητα ή να αποθηκευτούν σε μια βιβλιοθήκη ηλεκτρονικών εικόνων που προέρχονται από οπτικό μικροσκόπιο.

12.2. Αντικειμενοφόροι πλάκες μάρτυρες: Οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες πρέπει να εξετάζονται πριν από την εξέταση των δειγμάτων ασθενών για να εξασφαλισθεί ότι όλα τα αντιδραστήρια λειτουργούν ορθώς. Η παρουσία ενός προϊόντος αντίδρασης καφέ χρώματος (τετραυδροχλωρίδιο της 3,3'-διαμινοβενζιδίνης, DAB) στους πυρήνες των κυττάρων SiHa στην αντικειμενοφόρο μάρτυρα, με την εξέταση SurePath® με ProEx™ C δείχνει θετική δραστικότητα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα με αρνητικό μάρτυρα IgG ποντικού γενικής χρήσεως που χρωματίστηκε με την εξέταση SurePath® με ProEx™ C δεν πρέπει να παρουσιάζει καφέ πυρήνες και πρέπει να παρουσιάζει χρώση μόνον από την αντίχρωση αιματοξυλίνης.

12.3. Η βαθμολόγηση των αντικειμενοφόρων πλακών είναι μια διαδικασία 4 βημάτων.

Βήμα 1: Είναι το δείγμα ακριβές;
Το Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) αναφέρει, "Ενα επαρκές παρασκεύασμα υγρής βάσεως πρέπει να έχει ένα εκτιμώμενο αριθμό 5000 τουλάχιστον καλώς ορατών/διατηρημένων πλακωδών κυττάρων." Τα ίδια κριτήρια πρέπει να ισχύουν και για τις αντικειμενοφόρους πλάκες SurePath® με ProEx™ C. Ωστόσο, όπως και για τη συνήθη προετοιμασία Παπανικολάου, οποιοδήποτε δείγμα με μη φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν μια θετική μοριακή αντίδραση, είναι, εξ ορισμού, ικανοποιητικό προς αξιολόγηση. Αν η απάντηση στο βήμα αυτό είναι "ναι", προχωρήστε στο επόμενο βήμα. Αν η απάντηση είναι "όχι", το αποτέλεσμα είναι ***Μη ικανοποιητικό για αξιολόγηση***.

Βήμα 2: Υπάρχει μέτρια έως ισχυρή πυρηνική καφέ χρώση στα επιθηλιακά κύτταρα;
Για να απαντήσετε "ναι" στο βήμα αυτό, ερευνήστε για καφέ χρώση που είναι εύκολα ορατή. Αχνή ή "ξεθωριασμένη" καφέ χρώση δεν είναι επαρκής για να εγγυηθεί θετικό αποτέλεσμα. Αν δεν παρατηρείται καφέ πυρηνική χρώση, το αποτέλεσμα αναφέρεται ως ***Αρνητικό***. Αν παρατηρείται επαρκής καφέ χρώση, προχωρήστε στο επόμενο βήμα.

Βήμα 3: Το κύτταρο με πυρηνική καφέ χρώση είναι πλακώδες ή αδενικό;
Αν η απάντηση είναι ναι, προχωρήστε στο επόμενο βήμα. Αν η απάντηση είναι όχι, πρόκειται για ***Αρνητικό*** αποτέλεσμα της εξέτασης.

Βήμα 4: Είναι το κύτταρο; ASC (άτυπο πλακώδες κύτταρο) ή AGC (άτυπο αδενικό κύτταρο)?
Χρησιμοποιήστε τα ίδια μορφολογικά κριτήρια που διαλαμβάνονται στο The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) για να καθορίσετε αν το πλακώδες κύτταρο που περιέχει τον καφέ πυρήνα είναι ≥ ASC (άτυπο πλακώδες κύτταρο). Αν το κύτταρο θεωρηθεί ≥ASC (ή ≥AGC) τότε πρόκειται για ***Θετικό*** αποτέλεσμα της εξέτασης. Τούτο περιλαμβάνει ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, και καρκίνο. Αν το κύτταρο είναι αδενικής μορφής, ισχύουν τα κριτήρια TBS προκειμένου να προσδιοριστεί αν ένα κύτταρο είναι ≥ AGC (άτυπο αδενικό κύτταρο) εφαρμόζεται. Τούτο περιλαμβάνει ενδοτραχηλικό AGC, ενδομητριο AGC, AIS, και αδενοκαρκίνωμα. Αν το υπό εξέταση κύτταρο είναι συνεπές με NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy - αρνητικό για ενδοεπιθηλιακή βλάβη ή κακοήθεια) πρόκειται για ***Αρνητικό*** αποτέλεσμα της εξέτασης.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	Για *in vitro* διαγνωστική χρήση
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
Σ	Περιέχει 75 δοκιμασίες
	Προσοχή, συμβουλευτείτε τα συνοδευτικά έγγραφα
	Περιορισμοί θερμοκρασίας φύλαξης
LOT	Κωδικός παρτίδας
	Χρήση έως EEEE-MM-HH ή EEEE-MM
	Κατασκευαστής

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΗΠΑ
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Αναπτύχθηκε με την τεχνολογία της Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

και MILLENNIUM™ αποτελούν κατατεθέντα σήματα της Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Αντιδραστήρια ανίχνευσης παρέχονται από την

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

Το SurePath® αποτελεί σήμα κατατεθέν της TriPath Imaging, Inc.
Τα ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate είναι προϊόντα και εμπορικά σήματα της TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF 490500
490501

Σ 75

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. KULLANIM AMACI

SurePath® ve ProEx™ C Immunocytochemical Test (C İmmünositokimyasal Test), SurePath® Preservative Fluid (Koruyucu Sıvıları) içinde toplanan sitoloji numunelerinde anormal S-Faz indüksiyonunun kalitatif değerlendirilmesinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Test sonuçları servikal sitoloji tanısı için yardımcı bilgiler sağlar.

2. ÖZET VE AÇIKLAMA

Minikromozom idame (MCM) proteinleri ökaryotik DNA replikasyonunda önemli bir rol oynar. MCM proteinlerinin her biri, son derece korunumlu merkez alanlarında DNA'ya bağımlı ATPaz motiflerine sahiptir. Normal hücreler hücre döngüsünün G0 fazından G1/S fazına geçerken MCM proteinlerinin düzeyleri genel olarak değişken bir biçimde artar. Topoizomeraz II alfa (TOP2A), DNA replikasyonunda rol oynayan önemli bir nükleer enzimdir ve kanser tedavisinde kullanılan çoğu anti-kanser ilacının hedefidir. Düşük TOP2A ekspresyonu, bazı kemoterapötik ajanlara karşı baskın bir direnç mekanizmasıdır. Birçok farklı tümörde, bu proteinin ekspresyon aralığında belirgin bir varyasyon kaydedilmiştir. TOP2A, çoğalmakta olan hücrelerde baskındır ve M fazında belirli bölgelerde fosforilasyon ile değişime uğrar; bu da mitotik kromozom yoğunlaşması ve segregasyonu açısından kritik öneme sahiptir.

ProEx™ C Antibody Cocktail (Antikor Kokteyli), doku kültürü üst fazından saflaştırılmış ve protein stabilizatörleri ile %0,09 sodyum azid içeren tamponlu salin çözeltisinde seyreltilmiş fare monoklonal anti-MCM2 ve anti-TOP2A içerir.

3. PROSEDÜR İLKELERİ

SurePath® ve ProEx™ C Immunocytochemical Test (C İmmünositokimyasal Test) kiti bir antikor kokteyli, rutin olarak hazırlanan ince katmanlı servikal numunelere yönelik üç adımlı manuel veya otomatik immünositokimyasal boyama prosedürünü tamamlamak için gerekli saptama ve karşı boyama reaktifleri içerir. Numunenin tescilli bir fare antikor kokteyli ile enkübasyonunun ardından, benzersiz, kullanıma hazır, enzime bağlı bir antikor kromojen sistemi kullanılarak, bir pozitif test göstergesi olan seçici monoklonal antikor bağlama görüntülenir. Enzim reaktifi, dekstran polimer omurgasına bağlı sekonder bir keçi anti-fare, karaturp peroksidaz konjugatıdır. Spesifik bir kromojen eklenmesi, antijen-antikor bağlanma bölgelerinde lokalize edilen görünür bir kromojenik ürünün oluşumuna yol açar. Numuneye daha sonra hematoksilin ile karşı boyama yapılır, mavileştirici bir ajan uygulanır ve slayt lamele yerleştirilir. Sonuçlar ışık mikroskobu altında yorumlanır. İlgilenilen hücrelerin çekirdeği kahverengi boyandığında, yüksek dereceli servikal hastalığı gösteren pozitif bir sonuç elde edilmiş olur.

Otomatik görüntüleme ekipmanının kullanımıyla, potansiyel olarak pozitif slaytların bir referans galerisi oluşturulabilir. Daha sonra bu galeri gözden geçirilerek pozitif veya negatif bir sonuç belirlenebilir.

SurePath® ve ProEx™ C Immunocytochemical Test (C İmmünositokimyasal Test) hem manuel hem de otomatik boyama işlemlerine uygundur.

4. SAĞLANAN REAKTİFLER

75 ince katmanlı preparat için yeterli olan şu malzemeler bulunur:

Flakon No.	Açıklama	🌡
1a	**Peroksidaz Blok:** Tamponlu hidrojen peroksit artı stabilizatör ve tescilli bileşenler	2 – 8 °C
1b	**Protein Blok:** Saflaştırılmış kazein artı tescilli protein kombinasyonu (koruyucu ve yüzey aktif madde içeren değiştirilmiş PBS içinde)	2 – 8 °C
2	**Antikor Kokteyli:** Tween 20, pH 7,4 içeren TRIS tamponlu çözelti içinde sağlanan kullanıma hazır monoklonal antikor kokteyli. Stabilize edici proteinler ve antimikrobiyal ajan içerir	2 – 8 °C
3a	**Fare Probu:** Fare monoklonal antikorlarına bağlanır	2 – 8 °C
3b	**Polimer Reaktifi:** Fare Prob Reaktifine bağlanan karaturp peroksidaz ile konjüge polimer	2 – 8 °C
4a	**DAB Tampon Substratı:** DAB kromojeninin preparatında kullanılan substrat tamponu	2 – 8 °C
4b	**DAB:** 3,3'-diaminobenzidin kromojen çözeltisi	2 – 8 °C
5	**Hematoksilin:** Su bazlı Mayer Hematoksilini	15 – 30 °C
6	**Maviletirici Ajan:** Tween 20 ve %0,09 NaN_3 ile Tris tamponlu salin, pH 7,4	15 – 30 °C

5. GEREKLİ FAKAT SAĞLANMAMIŞ MALZEMELER

- Emici Bezler
- SureDetect™ SiHa Cell Line (Hücre Dizisi) – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Deiyonize veya Distile Su
- Etanol (%95 ve %100)
- Cam Lameller
- Eldiven
- Nem Haznesi
- Işık Mikroskobu (10x, 20x (isteğe bağlı), 40x objektif)
- Sabitleme Ortamı
- Pipetler ve Pipet Uçları (20µl, 200µl ve 1000µl hacim uygulayabilen)
- SureDetect™ Slide Preparation Buffer (Slayt Hazırlama Tamponu) 10X – REF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Ön İşlem Tamponu
- Boyama Kavanozları veya Banyoları
- Kronometre (1 – 60 dakika aralıkları ölçebilen)
- Tris Tamponlu Salin (TBS)
- Tween 20
- Evrensel Fare IgG Negatif Kontrolü
- Vorteks Karıştırıcı
- Ksilen veya Ksilen İkameleri
- Buharlayıcı/ su banyosu

6. UYARILAR

Xn - Tehlikeli	Kloral hidrat ***Risk ifadeleri:*** *22 Yutulması tehlikelidir.* ***Güvenlik ifadeleri:*** *23 Gazı/dumanı/buharı/spreyi solumayın.* *25 Gözle temasından kaçının.* *36 Uygun koruyucu giysi kullanın.* *45 Kaza halinde veya kendinizi kötü hissettiğinizde, derhal tıbbi yardım isteyin.* *60 Bu madde ve madde kabı tehlikeli madde olarak atılmalıdır.*
Xn - Harmful	3,3 diaminobenzidin ***Risk ifadeleri:*** *22 Yutulması tehlikelidir.* *40 Karsinojenik etkiye dair kısıtlı kanıt bulunmaktadır.* ***Güvenlik ifadeleri:*** *23 Gazı/dumanı/buharı/spreyi solumayın.* *36/37 Uygun koruyucu giysi ve eldivenler kullanın.* *60 Bu madde ve madde kabı tehlikeli madde olarak atılmalıdır*

7. ÖNLEMLER

7.1. *İn vitro* Diyagnostik Kullanım içindir.

7.2. Hazırlanan SurePath® slaytları, hazırlandıktan sonra en kısa sürede ön işlem tamponuna yerleştirilmelidir. Slaytlar ön işlem tamponunda en az 1 saat kalmalı, ancak immünositokimya işlemi öncesinde bu süre 72 saati aşmamalıdır.

7.3. Prosedür süresince hiçbir zaman slaytların tamamen kurumasına izin vermeyin. Prosedür sırasında kurumasına izin verilmiş slaytlar arka planı artırabilir.

7.4. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), tersine çevrilemez etkiler oluşturma potansiyel riskini taşıyan şüpheli bir karsinojen olarak sınıflandırılır. Fiziksel temastan ve uzun süreli veya tekrarlı olarak maruz kalmaktan kaçının. Kimyasal bir davlumbaz önemle tavsiye edilir. Gözlere, cilde veya giysilere gelmemesine dikkat edin. İşlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın. DAB çalışma çözeltisi prospektüse göre hazırlanmalıdır.

7.5. Bu kitteki bazı reaktifler, saf formunda son derece toksik bir kimyasal olan sodyum azidi (NaN_3) içerir. Sodyum azid yutulması veya cilt yoluyla absorbe edilmesi halinde ölümcül olabilir. Bu reaktifler solunmaları halinde zararlıdır. Bu reaktifler tehlikeli katılardır. Ciltte, gözlerde ve solunum yolunda tahrişe neden olur. Merkezi sinir sistemini, böbrekleri ve kardiyovasküler sistemi etkiler. Ürün konsantrasyonlarında tehlikeli olarak sınıflandırılmasa da, sodyum azid birikimleri kurşun ve bakır tesisatı ile reaksiyona girerek son derece patlayıcı metal azidlerini oluşturabilir. Attıktan sonra, tesisatta azid birikimini önlemek için bol miktarda suyla yıkayın.

7.6. Hematoksilin ve Maviletirici ajan: Bu reaktifler yutulmaları halinde zararlıdır. Hematoksilin ve Maviletirici ajanlar gözlerde, ciltte ve solunum yolunda tahriş yapan maddelerdir.

7.7. Numuneler ve numunelere maruz kalan tüm malzemelerle enfeksiyon bulaştırma gücü varmış gibi işlem yapılmalı ve bu malzemeler uygun önlemler alınarak atılmalıdır. Reaktifleri pipetle aktarırken asla ağzınızı kullanmayın ve cildin ve mukoz membranların reaktifler ve numuneler ile temas etmesinden kaçının. Reaktifler duyarlı alanlarla temas ederse, bol miktarda suyla yıkayın.

7.8. Spesifik olmayan boyamadan kaçınmak için reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonunu en aza indirin.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.9. Belirtilenlerin dışında enkübasyon süreleri, sıcaklıklar veya yöntemler hatalı sonuçlar verebilir.

7.10. Reaktifler optimum performans için seyreltilmiştir. Daha fazla seyreltme antijen boyama kaybına neden olabilir.

7.11. Kit bileşenleri lota özgüdür. Kit bileşenlerini, üretilmiş farklı lot numaralarının yerine kullanmayın. Lot numaraları ambalaj etiketlerinde görülebilir.

7.12. SurePath® ve ProEx® C Test kitini ambalajın üzerine basılmış son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Reaktifler prospektüste belirtilenin dışında herhangi bir koşul altında saklanırsa, kullanıcı bu koşulların geçerliliğini denetlemelidir.

7.13. Bu ürünün bozunmasını gösteren belirgin bir işaret yoktur. Bu nedenle, hasta numuneleriyle birlikte eşzamanlı olarak pozitif ve negatif kontroller çalıştırılmalıdır. Laboratuvar prosedürlerindeki varyasyonlar ile açıklanamayan beklenmedik bir boyanma gözlemlenirse veya SurePath® ve ProEx™ C Test kitiyle ilgili bir problem şüphesi doğarsa, TriPath Imaging teknik destek birimine başvurun.

7.14. Reaktifin gözler ve deriyle temasından kaçınmak için uygun Kişisel Koruyucu Donanımı giyin. Daha fazla bilgi için Malzeme Güvenlik Veri Dosyasına (MSDS) başvurun.

7.15. SurePath® ve ProEx® C Test, SurePath® Preservative Fluid (Koruyucu Sıvı) içinde toplanan servikal sitoloji numuneleriyle kullanılmak üzere tasarlanmıştır. SurePath® dışında geleneksel ve tek katmanlı preparatlar ile uyumluluğu değerlendirilmemiştir.

8. KULLANIM TALİMATLARI

8.1. Numune Hazırlama

8.1.1. Kalıntı SurePath® servikal sitoloji numunelerinden alınan slaytların hazırlanmasıyla ilgili talimatlar için SurePath® PrepStain System Kullanıcı Kılavuzu'na bakın.

8.1.2. SurePath® flakonundaki kalıntı numuneye (yaklaşık 2 mL) 8 mL SurePath® Preservative Fluid (Koruyucu Sıvı) ekleyin. Seyreltilmiş numune standart teknik kullanılarak BD PrepMate™ ve PrepStain üzerinde işlemden geçirilmelidir.

8.1.3. Hazırlanan SurePath® slaytları, hazırlandıktan sonra en kısa sürede SureDetect™ Slide Preparation Buffer (Slayt Hazırlama Tamponu) üzerine yerleştirilmelidir (Çalışma slayt çözeltisinin hazırlanması hakkında talimatlar için bkz. SureDetect™ Slide Preparation Buffer 10X). Slaytlar tampon içinde en az 1 saat kalmalı, ancak immünositokimya işlemi öncesinde bu süre 72 saati aşmamalıdır.

8.1.4. Optimum kit performansı için bir epitop geri getirme prosedürü kullanılmalıdır. Bu prosedür, hazırlanan slaytların SureDetect™ Slide Preparation Buffer (Slayt Hazırlama Tamponu) çalışma çözeltisi içinde oda sıcaklığında en az 1 saat süreyle ıslatılmasını ve ardından slaytların ön işlem tamponunda 95 °C sıcaklığa kadar ısıtılmasını kapsar. Slaytlar 15 dakika süreyle 95 °C'de tutulur ve sonra oda sıcaklığında 20 dakika süreyle soğumaya bırakılır. Gerekli sıcaklığı muhafaza edebilecek kapasitede kalibre edilmiş bir su banyosu veya buharlı sebze haşlayıcı önerilir. Yüksek rakımlarda bulunan laboratuvarlar gerekli sıcaklığı muhafaza etmek için en iyi yöntemi belirlemelidir. Boyama prosedürü, epitop geri getirme ve soğutma işleminin hemen ardından başlatılmalıdır. Açıklanan prosedürden sapılması sonuçları olumsuz etkileyebilir.

8.2. Reaktif Hazırlama

8.2.1. Boyama için aşağıdaki reaktifleri hazırlayın.

8.2.2. %0,05 Tween 20 içeren Tris Tamponlu Salin (TBST)

8.2.2.1. TBS'yi üreticinin spesifikasyonlarına göre hazırlayın.

8.2.2.2. TBS'de henüz yoksa, nihai konsantrasyon %0,05 olana dek Tween 20 ekleyin.

8.2.3. Substrat-Kromojen Çözeltisi (DAB) (5 slayt için yeterli hacim)

8.2.3.1. 1mL DAB Substrat Tamponunu (flakon 4a) test tüpüne aktarın.

8.2.3.2. Bir damla (20 – 30 µL) DAB Kromojen ekleyin (flakon 4b). İyice karıştırın ve bir pipet yardımıyla slaytlara uygulayın.

8.2.3.3. Substrat-Kromojen çözeltisini günlük olarak taze hazırlayın.

8.2.3.4. Çözelti içinde oluşabilecek çökelti boyama kalitesini etkilemez.

9. BOYAMA PROTOKOLÜ (Oda sıcaklığında [20 – 25 °C] gerçekleştirilir)

9.1. Boyama Prosedürüyle ilgili notlar

9.1.1. Kullanım öncesinde tüm bu talimatları dikkatle okuyun ve tüm bileşenleri iyice öğrenin (bkz. Önlemler).

9.1.2. İmmüno-boyama öncesinde tüm reaktiflerin oda sıcaklığına (20 – 25 °C) dengelenmesi gerekir.

9.1.3. Aksi belirtilmedikçe tüm enkübasyonlar oda sıcaklığında yapılmalıdır.

9.1.4. Boyama prosedürü süresince slaytların tamamen kurumasına izin vermeyin. Kurumuş hücre preparatlarında spesifik olmayan boyamanın arttığı görülebilir. Hava akımlarına maruz kalabilecek slaytları koruyun. Uzun süreli enkübasyonlar için slaytların nem haznesine yerleştirilmesi gerekir.

9.2. Epitop Geri Getirme

9.2.1. Hazırlanan slaytları, en az 1 saat ve en fazla 72 saat süreyle, SureDetect™ Slide Preparation (Slayt Hazırlama) tamponu çalışma çözeltisi içeren bir 'coplin jar' kabına koyun.

9.2.2. 95 °C'de 15 dakika boyunca bir su banyosu veya buharlayıcı içinde enkübe edin.

9.2.3. Slaytlarla birlikte tüm 'coplin jar' kabını su banyosundan veya buharlayıcıdan çıkarın ve slaytları tampon içinde 20 dakika süreyle soğumaya bırakın.

9.2.4. Slaytları deiyonize H_2O ile durulayın ve TBST içeren temiz bir 'coplin jar' kabına aktarın.

9.3. Bloke Edici Reaktif

9.3.1. Fazlalık tamponu hafifçe vurarak giderin.

9.3.2. Slaytları, hazırlanmış bir nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.3.3. Hücre birikim alanını örtmek için 200 µL Peroksidaz Blok reaktifi (flakon 1a) uygulayın.

9.3.4. 5 dakika (±1 dakika) enkübe edin.

9.3.5. Slaytları, TBST içinde durulayın (3 değişim, 2'şer dakika).

9.4. Protein Blok

9.4.1. Fazlalık tamponu hafifçe vurarak giderin.

9.4.2. Slaytları, hazırlanmış nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.4.3. Hücre birikim alanını tamamen örtmek için 200 µL Protein Blok (flakon 1b) uygulayın.

9.4.4. 5 dakika (±1 dakika) enkübe edin.

9.4.5. DURULAMAYIN.

9.5. Primer Antikor Kokteyli

9.5.1. Fazlalık Protein Blokunu hafifçe vurarak giderin.

9.5.2. Slaytları, hazırlanmış nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.5.3. Hücre birikim alanını tamamen örtmek için 200 µL ProEx™ C Ab Cocktail (C Ab Kokteyli) (flakon 2) uygulayın.

9.5.4. Oda sıcaklığında 30 dakika enkübe edin.

9.5.5. Yıkama şişesi kullanarak tek tek her slaydı TBST ile durulayın (akışı doğrudan hücre birikim alanına odaklamayın). Slaytları slayt rafına yükleyin.

9.5.6. Slaytları, TBST içinde durulayın (3 değişim, 2'şer dakika).

9.6. Saptama Kimyası

9.6.1. Fazlalık tamponu hafifçe vurarak giderin.

9.6.2. Slaytları, hazırlanmış bir nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.6.3. Hücre birikim alanını tamamen örtmek için 200 µL Fare Prob Reaktifi (flakon 3a) uygulayın.

9.6.4. 20 dakika (±1 dakika) enkübe edin.

9.6.5. Slaytları, TBST içinde durulayın (3 değişim, 2'şer dakika).

9.6.6. Fazlalık tamponu hafifçe vurarak giderin.

9.6.7. Slaytları, hazırlanmış bir nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.6.8. Hücre birikim alanını tamamen örtmek için 200 µL Polimer Reaktifi (flakon 3b) uygulayın.

9.6.9. 20 dakika (±1 dakika) enkübe edin.

9.6.10. Slaytları, TBST banyosunda durulayın (3 değişim, 2'şer dakika).

9.6.11. Fazlalık tamponu hafifçe vurarak giderin.

9.6.12. Slaytları, hazırlanmış nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.6.13. Hücre birikim alanını tamamen örtmek için 200 µL Substrat-Kromojen çözeltisi (DAB) uygulayın.

9.6.14. 5 dakika (±1 dakika) enkübe edin.

9.6.15. Slaytları, deiyonize H_2O içinde 5 dakika durulayın.

9.7. Karşı Boyama

9.7.1. Slaytları, TBST içinde durulayın (2 dakika için 1 değişim).

9.7.2. Slaytları, hazırlanmış bir nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

9.7.3. Hücre birikim alanını tamamen örtmek için 200 µL Hematoksilin karşı boyama (flakon 5) uygulayın.

9.7.4. 1 dakika (±10 saniye) enkübe edin.

9.7.5. Slaytları, akan H_2O altında 3 dakika durulayın.

9.7.6. Slaytları, hazırlanmış bir nem haznesine (suyla ıslatılmış kağıt havlular veya bezler ile dolu) yükleyin.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.7.7. 1 dakika (±10 saniye) süreyle 200 µL Mavileştirici Ajan (flakon 6) uygulayarak slaytları mavileştirin.

9.7.8. Akan su durulamasını 1 dakika süreyle yenileyin.

9.8. Sabitleme

9.8.1. 1 dakika veya 25 daldırma olarak slaytları %95 etanola daldırın.

9.8.2. Slaytları mutlak alkole daldırın (4 değişim, 1'er dakika veya 25 daldırma).

9.8.3. Ksilen ile temizleyin (3 değişim, 1'er dakika veya 25 daldırma).

9.8.4. Cam lameller kullanarak, susuz, kalıcı sabitleme ortamıyla slaytları lamele yerleştirin.

10. STABİLİTE

10.1. Açılmamış reaktif flakonları önerilen sıcaklıklarda saklandığında flakonun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

10.2. Reaktifler açıldıktan sonra, önerilen sıcaklıklarda saklandığı takdirde otuz gün stabildir.

11. KALİTE KONTROL

11.1. Sonuçlardaki değişkenlik çoğu zaman, önerilen test prosedürlerine göre sapma gösteren numune işlemedeki farklılıklardan kaynaklanır. Daha fazla bilgi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, *İmmünositokimya için Kalite Güvencesi* kalite kontrol standartlarına başvurun.

11.2. SureDetect™ SiHa Cell Control (Hücre Kontrolü), TriPath Imaging, Inc.'den bir pozitif kontrol olarak temin edilebilir. Her flakon, klinik numuneler ile benzer şekilde işlemden geçirilen bir servikal kanser hücre dizisi içerir. Evrensel fare IgG negatif kontrolü negatif kontrol olarak kullanılabilir. Her boyama prosedüründe bir pozitif ve bir de negatif kontrol slaydına yer verilmelidir. Boyama sonuçları, boyama çalışmasının geçerliliğinin bir göstergesi olarak kullanılmalıdır.

12. BOYAMAYI YORUMLAMA

12.1. Hasta ve Kontrol Örnekleri: Bir sitoteknolog veya patolog boyanmış slaytları ışık mikroskobu kullanarak değerlendirmelidir. Hücreler manuel olarak gözden geçirilebilir veya ışık mikroskobundan elde edilmiş bir elektronik görüntü galerisinde saklanabilir.

12.2. Kontrol Slaytları: Tüm reaktiflerin işlevini düzgün şekilde yerine getirdiğinden emin olmak için, hasta numunelerinin gözden geçirilmesinden önce pozitif ve negatif kontrol slaytları incelenmelidir. SurePath® ve ProEx™ C Test ile boyanmış SiHA Hücre Kontrol slaydının çekirdeklerinde kahverengi bir reaksiyon ürününün (3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorür, DAB) bulunması pozitif reaktiviteyi gösterir. SurePath® ve ProEx™ C Test ile boyanmış evrensel fare IgG negatif kontrol slaydında kahverengiye boyanan hiçbir çekirdek bulunmamalı ve yalnızca hematoksilin karşı boyama kaynaklı boyama sergilemelidir.

12.3. Slaytlara skor verilmesi 4 adımlı bir prosestir.

1. Adım: Numune yeterli mi?

Servikal Sitoloji Raporlaması (2nci Bs.) için Bethesda Sistemi (TBS), "Yeterli bir sıvı bazlı preparatta tahmini olarak en az 5000 iyi görüntülenen / iyi korunan skuamöz hücre olması gerektiğini" belirtir. Aynı kriterler SurePath® ve ProEx™ C slaytlar için de geçerli olmalıdır. Bununla birlikte, rutin bir Pap preparatında olduğu gibi, pozitif moleküler reaksiyon sergileyen anormal hücreler içeren her numune, tanım itibariyle, değerlendirme için tatmin edicidir. Bu adımda yanıt "evet" ise, sonraki adıma geçin; yanıt "hayır" ise sonuç ***Değerlendirme için Tatmin Edici Değil*** olmalıdır.

2. Adım: Epitelyal hücrelerde orta ila yoğun derecede kahverengi çekirdek boyanması var mı?

Bu adımda "evet" yanıtını verebilmek için, kolayca görüntülenebilen kahverengi boyama arayın. Yalnızca soluk veya "kızarık" şeklinde kahverengi görülüyorsa, pozitif işlemi garanti etmek için bu yeterli değildir. Hiçbir kahverengi çekirdek boyanması görünmüyorsa sonuç ***Negatif*** olarak rapor edilir. Yeterli kahverengi boyama görünüyorsa sonraki adıma geçin.

3. Adım: Çekirdeğinde kahverengi boyanma olan hücre bir skuamöz hücre mi, yoksa glandüler hücre mi?

Yanıt "evet" ise sonraki adıma geçin. Yanıt "hayır" ise bu ***Negatif*** bir test sonucudur.

4. Adım: Hücre ≥ ASC (atipik skuamöz hücre) mi, yoksa AGC (atipik glandüler hücre) mi?

Kahverengi çekirdeği içeren skuamöz hücrenin ≥ ASC (atipik skuamöz hücre) olup olmadığını belirlemek için, Servikal Sitoloji Raporlaması (2nci Bs.) için Bethesda Sistemi (TBS) içinde özetlenen morfolojik kriterlerin aynılarını kullanın. Hücrenin ≥ASC (veya ≥AGC) olduğu değerlendirilirse, bu bir ***Pozitif*** test sonucu olur. Bu da ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL ve kanseri kapsar. Hücre görünüm olarak glandüler ise, hücrenin ≥ AGC (atipik glandüler hücre) olup olmadığını belirlemeye yönelik TBS kriterleri geçerli olur. Bu da endoservikal AGC, endometriyal AGC, AIS ve adenokarsinomu kapsar. Söz konusu hücre NILM (intraepitelyal lezyon veya malignansi için negatif) ile tutarlıysa, bu ***Negatif*** test sonucudur.

13. REFERANSLAR

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. SEMBOL SÖZLÜĞÜ

REF	Katalog numarası
IVD	*İn vitro* diyagnostik kullanım içindir
	Kullanım talimatlarına bakın
Σ	75 test içerir
	Dikkat, ilgili belgeye bakın
	Saklama Sıcaklığı Sınırları
LOT	Seri Kodu
	Son kullanma: YYYY-AA-GG veya YYYY-AA
	Üretici

TEKNİK DESTEK

ABD
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215, ABD

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
İrlanda

CE

Millennium Pharmaceuticals, Inc. teknolojisiyle geliştirilmiştir.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ Millennium Pharmaceuticals, Inc. şirketinin ticari markalarıdır.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 ABD
www.millennium.com

Saptama Reaktifleri tedarikçisi

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath®, TriPath Imaging, Inc. şirketinin bir ürünü ve tescilli ticari markasıdır.
ProEx, SureDetect, PrepStain ve PrepMate, TriPath Imaging, Inc. şirketinin ürünleri ve ticari markalarıdır.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. AVSEDD ANVÄNDNING

SurePath® med ProEx™ C immunocytokemiskt test är avsett för kvalitativ utvärdering av avvikande S-fasinduktion i cervixprover som samlats in i SurePath® konserveringsvätska. Testresultaten ger ytterligare information för cervikal cytologisk diagnos.

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

MCM-proteiner (minichromosome maintanance) spelar en viktig roll vid eukaryotisk DNA-replikation. Var och en av MCM-proteinerna har DNA-beroende ATPase-motiv i sin mycket konserverade centrala domän. Nivåerna av MCM-proteiner ökar i allmänhet på ett varierat sätt eftersom normala celler utvecklas från G0- till G1/S-fasen i cellcykeln. Topoisomeras II alfa (TOP2A) är ett viktigt kärnenzym som deltar i DNA-replikationen och är ett mål för många läkemedel mot cancer som används vid cancerbehandling. Ett minskat uttryck av TOP2A är en framträdande försvarsmekanism mot flera kemoterapeutiska medel. En betydande variation inom uttrycksintervallet av detta protein har noterats i många olika tumörer. TOP2A är framträdande vid celldelning och ändras i M-fasen genom fosforylering på specifika platser, vilket är avgörande för mitotisk kromosomkondensation och -segregation.

ProEx™ C antikroppscocktail innehåller musmonoklonalt anti-MCM2 och anti-TOP2A som renats från vävnadskultursupernatant och spätts med buffrad koksaltlösning som innehåller proteinstabilisatorer och 0,09 % natriumazid.

3. PROCEDURPRINCIPER

SurePath® med ProEx® C immunocytokemiskt testkit innehåller en antikroppscocktail, detekterings- och kontrollfärgningsreagenser som behövs för att genomföra en automatisk eller manuell immunocytokemisk färgningsprocedur i tre steg av rutinmässigt beredda cervikala prover i tunna skikt. Efter inkubationen av provet med en egen musantikroppscocktail, visualiseras selektiv monoklonal antikroppsbindning, som anger ett positivt test, med hjälp av ett unikt, enzymlänkat antikroppskromogensystem, färdigt att användas. Enzymreagenset är ett sekundärt anti-muspepparrotsperoxidaskonjugat från get som är länkat till en dextranpolymerstomme. Tillsats av en specifik kromogen resulterar i bildning av en synlig kromogen produkt som är lokaliserad till bindningsställena för antigener-antikroppar. Provet motfärgas därefter med hematoxylin, Ett blåfärgande medel appliceras och objektglaset förses med ett täckglas. Resultaten tolkas med hjälp av ett ljusmikroskop. Ett positivt resultat, som anger höggradig cervikal sjukdom, erhålls när kärnorna i de undersökta cellerna färgas bruna.

Ett referensgalleri av potentiellt positiva objektglas kan skapas med hjälp av automatisk avbildningsutrustning. Galleriet kan därefter granskas för att fastställa ett positivt eller negativt resultat.

SurePath® med ProEx™ C immunocytokemiskt test är tillämpligt för både manuell och automatiskt färgning.

4. REAGENSER SOM TILLHANDAHÅLLS

Följande material ingår och räcker till 75 tunnskiktspreparat:

Vial nr.	Beskrivning	
1a	**Peroxidasblock:** Buffrad vätesuperoxid plus stabiliseringsmedel och egna komponenter.	2 – 8 °C
1b	**Proteinblock:** Renat kasein plus egen kombination av proteiner i modifierat PBS med konserveringsmedel och ytaktivt ämne.	2 – 8 °C
2	**Antikroppscocktail:** Monoklonal antikroppscocktail som levereras i en TRIS-buffrad lösning med Tween 20, pH 7,4, klar att användas. Innehåller stabiliserande proteiner och antimikrobiellt medel.	2 – 8 °C
3a	**Musprob:** Binder till musmonoklonala antikroppar.	2 – 8 °C
3b	**Polymerreagens:** Polymer konjugerat med pepparrotsperoxidas som binder till musprobreagens.	2 – 8 °C
4a	**DAB-buffertsubstrat:** Substratbuffert som används vid preparation av DAB-kromogen.	2 – 8 °C
4b	**DAB:** 3,3'-diaminobezidinkromogenlösning	2 – 8 °C
5	**Hematoxylin:** Vattenbaserad Mayers hematoxylin	15 – 30 °C
6	**Blåfärgande medel:** Trisbuffrad koksaltlösning, pH 7,4 med Tween 20 och 0,09 % NaN_3	15 – 30 °C

5. MATERIAL OCH REAGENSER SOM KRÄVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

- Absorberande servetter
- SureDetect™ SiHa Cell Line – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Etanol (95 % och 100 %)
- Täckglas av glas
- Handskar
- Fuktkammare
- Ljusmikroskop (10x-, 20x- (tillval), 40x-objektiv)
- Monteringsmedel
- Pipetter och pipettspetsar (klarar att avge volymer på 20µl, 200µl och 1000µl)
- SureDetect™ Buffert 10X för preparering av objektglas – 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – Förprepareringsbuffert
- Färgningsbehållare eller bad
- Timer (klarar intervaller på 1-60 minuter)
- Tris buffrad koksaltlösning (TBS)
- Tween 20
- Universell IgG-negativ kontroll från mus
- Skakapparat
- Xylen eller Xylenersättningar
- Ångkokare/vattenbad

6. VARNINGAR

Xn - Farligt	Kloralhydrat ***Riskfraser:*** *22 Farligt vid förtäring.* ***Säkerhetsfraser:*** *23 Undvik inandning av gas/rök/ånga/dimma.* *25 Undvik kontakt med ögon.* *36 Använd lämpliga skyddskläder.* *45 Vid olycksfall eller illamående, kontakta omedelbart läkare.* *60 Detta material och dess behållare skall tas om hand som farligt avfall.*
Xn - Farligt	3,3 diaminobenzidin ***Riskfraser:*** *22 Farligt vid förtäring.* *40 Misstänks kunna ge cancer.* ***Säkerhetsfraser:*** *23 Undvik inandning av gas/rök/ånga/dimma.* *36/37 Använd lämpliga skyddskläder och -handskar.* *60 Detta material och dess behållare skall tas om hand som farligt avfall.*

7. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

7.1. För *in vitro*-diagnostik.

7.2. Preparerade SurePath®-objektglas måste placeras i förbehandlingsbufferten direkt när de preparerats. Objektglasen måste vara kvar i förbehandlingsbufferten i minst 1 timme men inte längre än 72 timmar före immunocytokemianalys.

7.3. Låt inte objektglasen torka någon gång under proceduren. Objektglas som har torkat ut under proceduren kan öka bakgrunden.

7.4. 3,3'-diaminobenzidin (DAB) klassificeras som en misstänkt karcinogen med potentiell risk för att producera irreversibla effekter. Undvik fysisk kontakt och långvarig eller upprepad exponering. En kemisk rökkåpa rekommenderas. Undvik kontakt med ögonen, huden eller klädsel. Tvätta händerna noga efter hantering. DAB arbetslösning ska prepareras enligt bipacksedeln.

7.5. Vissa reagenser i detta kit innehåller natriumazid (NaN_3), en mycket toxisk kemikalie i ren form. Natriumazin kan vara dödligt om det sväljs eller absorberas genom huden. Dessa reagenser är skadliga om de inhaleras. Dessa reagenser är farliga fasta ämnen. De orsakar irritation av huden, ögon och andningsvägarna. Påverkar centrala nervsystemet, njurar samt hjärt- och kärlsystemet. Trots att det inte klassificerats som farligt vid produktkoncentration, kan natriumazidansamlingar reagera med bly- och kopparledningar och bilda högexplosiva metallazider. Vid bortskaffning skall man spola med stora mängder vatten för att förhindra azidansamling i ledningarna.

7.6. Hematoxylin och blåfärgningsmedel: Dessa reagenser är skadliga om de sväljs. Hematoxylin och blåfärgande medel är irriterande för ögon, hud och andningsorgan.

7.7. Proverna och alla material som utsätts för proverna ska hanteras som om de kan överföra infektion och kasseras med tillämpliga försiktighetsåtgärder. Pipettera aldrig reagenser med munnen och undvik kontakt med huden och slemhinnor Tvätta rikligt med vatten om reagenserna kommer i kontakt med känsliga områden.

7.8. Minimera den mikrobiella kontaminationen av reagenser för att undvika ej specifik färgning.

7.9. Andra inkubationstider, temperaturer eller metoder än vad som anges kan ge felaktiga resultat.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.10. Reagenserna har spätts för optimal prestanda. Ytterligare spädning kan resultera i utebliven antigenfärgning.

7.11. Kitets komponenter är lotspecifika. Byt inte ut kitkomponenter mot komponenter med andra lotnummer. Lotnumren sitter på förpackningens etiketter.

7.12. Använd inte SurePath® med ProEx™ C testkit efter det utgångsdatum som är stämplat på förpackningen. Användaren måste validera tillståndet om reagensen förvaras under andra förvaringsvillkor än de som anges på förpackningsinlagan.

7.13. Det finns inga tydliga tecken som anger att denna produkt har försämrats. Därför bör positiva och negativa kontroller köras samtidigt med patientproverna. Om oväntad färgning iakttas, som inte kan förklaras med variationer i laboratorieprocedurerna eller om ett problem med SurePath® med ProEx™ C testkit misstänks kontaktar du teknisk support för TriPath Imaging.

7.14. Använd tillämplig personlig skyddsutrustning för att undvika att reagenset kommer i kontakt med ögonen eller huden. Se databladet för materialsäkerhet för ytterligare information.

7.15. SurePath® med ProEx™ C test är avsett för användning med cervikala cytologiprover som samlats in i SurePath® konserveringsvätska. Kompatibilitet med andra konventionella preparat och enkelskiktspreparat än SurePath® har inte utvärderats.

8. BRUKSANVISNING

8.1. Provberedning

8.1.1. I bruksanvisningen till SurePath® PrepStain System finns instruktioner för preparering av objektglas från SurePath® cervikala överskottcytologiprover.

8.1.2. Tillsätt 8 mL SurePath® konserveringsvätska till överskottprovet i SurePath®-vialen (cirka 2 mL). Det spädda provet ska bearbetas på BD PrepMate™ med hjälp av standardteknik och på PrepStain.

8.1.3. Preparerade SurePath®-objektglas måste placeras i SureDetect™ prepareringsbuffert för objektglas så snart som de preparerats (anvisningar för preparering av en arbetslösning för objektglas finns i SureDetect™ prepareringsbuffert 10X för objektglas). Objektglasen måste vara kvar i bufferten i minst 1 timme men inte längre än 72 timmar före immunocytokemianalys.

8.1.4. En epitopåtervinningsprocedur måste användas för optimal prestanda för kitet. Denna procedur innefattar blötläggning av preparerade objektglas i en arbetslösning med SureDetect™ buffert för preparering av objektglas i minst 1 timme i rumstemperatur följt av uppvärmning av objektglasen i förbehandlingsbufferten till 95 °C. Objektglasen hålls vid 95 °C i 15 minuter och tillåts svalna till rumstemperatur i 20 minuter. Användning av ett kalibrerat vattenbad eller ångkokare som klarar att bibehålla den önskade temperaturen rekommenderas. Laboratorier som är placerade på högre höjder bör fastställa bästa metod för att bibehålla önskad temperatur.
Färgningsproceduren ska initieras omedelbart efter epitopåtervinningen och nedkylningen. Avvikelser från den återgivna proceduren kan påverka resultaten negativt.

8.2. Reagenspreparering

8.2.1. Preparera följande reagenser före färgning.

8.2.2. Tris buffrad koksaltlösning, med 0,05 % Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. Preparera TBS enligt tillverkarens specifikationer.

8.2.2.2. Tillsätt Tween 20 till en slutgiltig koncentration på 0,05 %, om det inte redan finns i TBS.

8.2.3. Substrat-kromogen lösning (DAB) (volymen räcker till 5 objektglas)

8.2.3.1. Överför 1 mL DAB substratbuffert (vial 4a) till ett provrör.

8.2.3.2. Tillsätt en droppe (20–30 µL) DAB kromogen (vial 4b). Blanda noggrant och applicera på objektglasen med en pipett.

8.2.3.3. Preparera färsk substrat-kromogenlösning varje dag.

8.2.3.4. Färgningens kvalitet påverkas inte av utfällningar som kan bildas i lösningen.

9. FÄRGNINGSPROTOKOLL (genomförs i rumstemperatur, 20 – 25 °C)

9.1. Anmärkningar om färgningsprocedurer

9.1.1. Läs alla dessa instruktioner noga och bekanta dig med alla komponenter före användning (se Försiktighetsåtgärder).

9.1.2. Alla reagenser ska ekvilibreras till rumstemperatur (20 – 25 °C) före immunfärgning.

9.1.3. Alla inkubationer ska genomföras i rumstemperatur om inget annat anges.

9.1.4. Låt inte objektglasen torka någon gång under färgningsproceduren. Torkade cellprepareringar kan uppvisa ökad ospecificerad färgning. Skydda objektglasen mot drag. Objektglasen ska placeras i en fuktkammare vid längre inkubationer.

9.2. Epitopåtervinning

9.2.1. Placera de preparerade objektglasen i ett coplinkärl som innehåller en arbetslösning av SureDetect™ buffert för preparering av objektglas i minst 1 timme upp till maximalt 72 timmar.

9.2.2. Inkubera i vattenbad eller ångkokare i 15 minuter vid 95 °C.

9.2.3. Avlägsna hela coplinkärlet med objektglas från vattenbadet eller ångkokaren och låt objektglasen svalna i bufferten i 20 minuter.

9.2.4. Skölj objektglasen med avjoniserat vatten och överför till ett rent coplinkärl som innehåller TBST.

9.3. Blockerande reagens:

9.3.1. Knacka bort all kvarvarande buffert.

9.3.2. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.3.3. Applicera 200 µL peroxidasblockeringsreagens (vial 1a) så att det täcker cellavlagringsytan.

9.3.4. Inkubera i 5 minuter (±1 minut).

9.3.5. Skölj objektglasen i TBST, 3 byten, 2 minuter vardera.

9.4. Proteinblock

9.4.1. Knacka bort all kvarvarande buffert.

9.4.2. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.4.3. Applicera 200 µL proteinblock (vial 1b) så att det täcker cellavlagringsytan helt.

9.4.4. Inkubera i 5 minuter (±1 minut).

9.4.5. SKÖLJ INTE.

9.5. Primär antikroppscocktail

9.5.1. Knacka bort all kvarvarande proteinblock.

9.5.2. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.5.3. Applicera 200 µL ProEx™ C Ab-cocktail (vial 2) så att det täcker cellavlagringsytan helt.

9.5.4. Inkubera 30 minuter vid rumstemperatur.

9.5.5. Skölj varje objektglas individuellt med TBST genom att använda en diskborste (rikta inte flödet direkt mot cellavlagringsytan). Ladda objektglasen i ett objektglasställ.

9.5.6. Skölj objektglasen i TBST, 3 byten, 2 minuter vardera.

9.6. Detekteringskemi

9.6.1. Knacka bort all kvarvarande buffert.

9.6.2. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.6.3. Applicera 200 µL musprobreagens (vial 3a) så att det täcker cellavlagringsytan helt.

9.6.4. Inkubera i 20 minuter (±1 minut).

9.6.5. Skölj objektglasen i TBST, 3 byten, 2 minuter vardera.

9.6.6. Knacka bort all kvarvarande buffert.

9.6.7. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.6.8. Applicera 200 µL polymerreagens (vial 3b) så att det täcker cellavlagringsytan.

9.6.9. Inkubera i 20 minuter (±1 minut).

9.6.10. Skölj objektglasen i TBST-badet, 3 byten, 2 minuter vardera.

9.6.11. Knacka bort all kvarvarande buffert.

9.6.12. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.6.13. Applicera 200 µL substratkromogen lösning (DAB) så att det täcker cellavlagringsytan helt.

9.6.14. Inkubera i 5 minuter (±1 minut).

9.6.15. Skölj objektglasen i 5 minuter i avjoniserat vatten.

9.7. Kontrollfärg

9.7.1. Skölj objektglasen i TBST, 1 byte i 2 minuter.

9.7.2. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

9.7.3. Applicera 200 µL hematoxylinkontrollfärg (vial 5) så att det täcker cellavlagringsytan helt.

9.7.4. Inkubera i 1 minut (±10 sekunder).

9.7.5. Skölj objektglasen i 3 minuter i rinnande vatten.

9.7.6. Ladda objektglasen i en preparerad fuktkammare (fylld med pappershanddukar eller kompresser fuktade med vatten).

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.7.7. Blåfärga objektglasen genom att applicera 200 µL blåfärgningsmedel (vial 6) i 1 minut (±10 sekunder).

9.7.8. Upprepa sköljningen i rinnande vatten i 1 minut.

9.8. Montering

9.8.1. Sänk ned objektglasen i 95 % etanol, 1 minut eller 25 doppningar.

9.8.2. Sänk ned objektglasen i absolut alkohol, 4 byten, 1 minut vardera eller 25 doppningar.

9.8.3. Klargör med xylen, 3 byten, 1 minut vardera eller 25 doppningar.

9.8.4. Täck objektglasen med permanent ej vattenlösligt monteringsmedel med hjälp av täckglas av glas.

10. STABILITET

10.1. Vid förvaring vid de rekommenderade temperaturerna är oöppnade reagensvialer stabila till det utgångsdatum som anges på vialen.

10.2. När de öppnats är reagenserna stabila i trettio dagar när de förvarats vid de rekommenderade temperaturerna.

11. KVALITETSKONTROLL

11.1. Variabilitet i resultaten härleds ofta från skillnader i provhantering som avviker från de rekommenderade testprocedurerna. Ytterligare information finns i de föreslagna riktlinjerna för kvalitetskontroll från Clinical and Laboratory Standards Institute, *Quality Assurance for Immunocytochemistry*.

11.2. SureDetect™ SiHa cellkontroll finns tillgänglig som en positiv kontroll från TriPath Imaging, Inc. Varje vial innehåller en cervikal cancercellinje som bearbetas på samma sätt som de kliniska proverna. En universell IgG-negativ kontroll från mus kan användas som negativ kontroll. Ett positivt och ett negativt kontrollobjektglas ska ingå i varje färgningsprocedur. Färgningsresultaten ska används som en indikation på validiteten för färgningskörningen.

12. TOLKNING AV FÄRGNINGEN

12.1. Patient- och kontrollprover: En cytoanalystekniker eller patolog bör utvärdera de färgade objektglasen med ett ljusmikroskop. Cellerna kan granskas manuellt eller sparas i ett elektroniskt bildgalleri som härletts från ett ljusmikroskop.

12.2. Kontrollobjektglas: De positiva och negativa kontrollobjektglasen ska undersökas före granskningen av patientproverna för att säkerställa att alla reagenser fungerade korrekt. Förekomst av en brun reaktionsprodukt (3,3'-diaminobenzidintetrahydroklorid, DAB) i kärnan av SiHa cellkontrollobjektglas som färgats med SurePath® med ProEx™ C-test anger positiv reaktivitet. Den universella IgG-negativa muskontrollobjektglaset som färgats med SurePath® with ProEx™ C-test ska inte ha någon brunfärgad kärna och ska endast ha färgning från hematoxylinkontrollfärgen.

12.3. Poängbedömningen av objektglas är en process i 4 steg.

Steg 1: Är provet tillräckligt?
Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) fastslår "En tillräcklig vätskebaserad beredning ska ha en uppskattad minsta mängd på minst 5 000 väl visualiserade/väl konserverade skivepitelceller". Samma kriterier bör gälla för SurePath® med ProEx™ C-objektglas. Men som vid rutinmässig cellpreparering är alla prover med onormala celler, som uppvisar en positiv molekylär reaktion per definition tillfredsställande för utvärdering. Om svaret vid detta steg är "ja" fortsätter du till nästa steg. Om svaret är "nej" är resultatet ***Otillfredsställande för utvärdering***.

Steg 2: Finns det måttlig till intensiv brun färgning av kärnan i epitelcellerna?
För att svara "ja" i detta steg letar du efter brun färgning som lätt kan visualiseras. Om det bara är en blek mängd, eller brun antydan, är detta inte tillräckligt för att garantera ett positivt svar. Om ingen brun färg syns i kärnan, rapporteras resultatet som ***Negativt***. Om tillräcklig brun färgning visualiseras fortsätter du till nästa steg.

Steg 3: Är cellen med brun kärnfärning en skivepitelcell eller en glandulär cell? Om svaret är "ja", fortsätter du till nästa steg. Om svaret är "nej", är detta ett ***Negativt*** testresultat.

Steg 4: Är cellen ≥ ASC (atypical squamous cell – atypisk skivepitelcell) eller AGC (atypical glandular cell – atypisk glandulärcell)?
Använd samma morfologiska kriterier som anges i The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) för att fastställa om skivepitelcellen som innehåller den bruna kärnan är ≥ ASC Om cellen betraktas som ≥ASC (eller ≥AGC) är detta ett ***Positivt*** testresultat. Denna innefattar ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL och cancer. Om cellen är glandulär till utseendet, gäller TBS-kriterierna för bestämning av om en cell är ≥ AGC. Detta innefattar endocervikal AGC, endometrial AGC, AIS och adenokarcinom. Om cellen i fråga är förenlig med NILM (negativ för intraepitelial lesion eller malignitet) är detta ett ***Negativt*** testresultat.

13. REFERENSER

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. SYMBOLFÖRTECKNING

REF	Katalognummer
IVD	För *in vitro*-diagnostik
	Se bruksanvisningen
Σ	Innehåller 75 tester
	Försiktigt! Se medföljande dokumentation
	Begränsningar för förvaringstemperaturen
LOT	Batchkod
	Använd senast ÅÅÅÅ-MM-DD eller ÅÅÅÅ-MM
	Tillverkare

TEKNISK INFORMATION
USA
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215, USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Utvecklat med teknik från Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

MILLENNIUM™ är varumärken som tillhör Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Detekteringsreagenser levereras av

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® är en produkt och ett registrerat varumärke som tillhör TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate är produkter och varumärken som tillhör TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

SurePath®
with ProEx™ C
Immunocytochemical Test

REF **490500**
490501

Σ **75**

005-11000-12
005-11000-13

IVD

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноцитохимический тест SurePath® и ProEx™ C предназначен для количественного определения аберрантной S-фазной индукции в цитологических образцах из шейки матки, собранных в консервирующей жидкости® SurePath. Тест обеспечивает дополнительную информацию для цитологического диагноза.

2. КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

Белки поддержания минихромосом (MCM) играют важную роль в эукариотической репликации ДНК. Каждый из белков MCM имеет ДНК-зависимые АТФазные мотивы в своем высококонсервативном центральном домене. Уровни белков MCM в общем случае растут переменным образом, когда нормальные клетки переходят от фазы G0 к фазе G1/S клеточного цикла. Топоизомераза II альфа (TOP2A), существенный ядерный фермент, участвующий в репликации ДНК, является мишенью многих противоопухолевых препаратов, используемых в терапии рака. Пониженная экспрессия TOP2A — преобладающий механизм резистентности к некоторым химиотерапевтическим агентам. Во многих различных опухолях наблюдали значительные вариации в уровне экспрессии этого белка. TOP2A преобладает в пролиферирующих клетках и в фазе M он модифицируется посредством фосфорилирования в специфических центрах, которое критично для конденсации и разделения митотических хромосом.

Смесь антител ProEx™ C содержит мышиные моноклональные антитела MCM2 и TOP2A, выделенные из супернатанта культуры ткани и разбавленные забуференным физраствором, содержащим стабилизаторы белка и 0,09 % азида натрия.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Набор для иммуноцитохимического теста SurePath® с ProEx™ C содержит смесь антител, реагенты для обнаружения и контрастного окрашивания, необходимые для выполнения процедуры трехстадийного ручного или автоматического иммуноцитохимического окрашивания обычным образом приготовленных тонкослойных образцов из шейки матки. После инкубации образца с патентованной смесью мышиных антител, связывание селективных моноклональных антител, указывающее на положительную реакцию, визуализируется при помощи уникальной, готовой к употреблению, системы ферментативно связанных антител и хромогена. Ферментативный реагент — это вторичный козий антимышиный конъюгат пероксидазы хрена связанный с декстрановым полимерным скелетом. Добавление специфического хромогена приводит к образованию видимого хромогенного продукта, локализованного в центре связывания антигена с антителом. Затем образец контрокрашивают гематоксилином, подсинивают и покрывают покровным стеклом. Результаты интерпретируют под световым микроскопом. Положительный результат свидетельствующий о высокой степени заболевания шейки матки получают, когда ядра в искомых клетках окрашены в коричневый цвет.

С помощью оборудования автоматизированной визуализации можно создать сравнительную галерею потенциально положительных препаратов. Этой галереей можно пользоваться для определения позитивного или негативного результата.

Иммуноцитохимический тест SurePath® с ProEx™ C применим для ручного и автоматического окрашивания.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

Нижеперечисленные вещества включены в поставку в количестве, достаточном для тестирования 75 тонкослойных препаратов:

Номер флакона	Описание	
1a	**Пероксидазный блок** — Забуференный пероксид водорода со стабилизатором и патентованные компоненты	2–8°C
1b	**Белковый блок** — Очищенный казеин с патентованным сочетанием белков в модифицированном буферном физрастворе с консервантом и сурфактантом	2–8°C
2	**Смесь антител** — Готовые к применению моноклональные антитела, поставляемые в трис-буфере с Tween 20, pH 7,4. Содержит стабилизированные белки и антибактериальный агент.	2–8°C
3a	**Мышиный зонд** — связывается с мышиными моноклональными антителами	2–8°C
3b	**Полимерный реагент** — полимер, конъюгированный с пероксидазой хрена, которая связывается с реагентом “Мышиный зонд”	2–8°C
4a	**Буфер субстрата DAB** — буфер субстрата, используемый для приготовления хромогена DAB	2–8°C
4b	**DAB** — раствор 3,3’-диаминобензидинового хромогена	2–8°C
5	**Гематоксилин** — водный раствор Майеровского гематоксилина	15–30°C
6	**Синий краситель** — трис-буферный физраствор, pH 7,4 с Tween 20 и 0,09 % NaN_3	15–30°C

5. ВЕЩЕСТВА И РЕАГЕНТЫ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

- Абсорбент Wipes
- SureDetect™ SiHa клеточный штамм – REF 005-11012-10 (TriPath Imaging, Inc.)
- Деионизированная или дистиллированная вода
- Этанол (95 % и 100 %)
- Покровные стекла
- Перчатки
- Влажная камера
- Световой микроскоп(10x, 20x (опция), объективы 40x)
- Среда для заливки
- Пипетки и наконечники (для объемов 20 µл, 200 µл и 1000 µл)
- Буфер SureDetect™ для подготовки покровных стекол 10X – REF 090-11008-10 (TriPath Imaging, Inc.) – буфер предобработки
- Банка или ванночка для окрашивания
- Таймер (с интервалами от 1 до 60 минут)
- Физраствор с трис-буфером (TBS)
- Tween 20
- Универсальный мышиный IgG негативный контроль
- Мешалка вортекс
- Ксилол или заменители ксилола
- паровая или водяная баня

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Xn — ОПАСНО	Хлоральгидрат ***Предупреждения:*** *22 Опасно при проглатывании.* ***Инструкции по безопасности:*** *23 Не вдыхать газ/пыль/пары/аэрозоли.* *25 Избегать попадания в глаза и на кожу.* *36 Наденьте соответствующую защитную одежду.* *45 В случае происшествий или при плохом самочувствии немедленно обратиться за медицинской помощью.* *60 Данный материал и его тару следует утилизировать как опасные отходы.*
Xn — ОПАСНО	3,3-диаминобензидин ***Предупреждения:*** *22 Опасно при проглатывании.* *40 Ограниченные сведения о канцерогенном действии.* ***Инструкции по безопасности:*** *23 Не вдыхать газ/пыль/пары/аэрозоли.* *36/37 Надевать соответствующую защитную одежду и перчатки.* *60 Данный материал и его тару следует утилизировать как опасные отходы.*

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

7.1. Для диагностического применения *in vitro.*

7.2. Приготовленные препараты SurePath® должны быть помещены в буфер предобработки сразу после приготовления. Препараты должны оставаться в нем по меньшей мере 1 hour, но не дольше 72 час перед иммуноцитохимией.

7.3. Не допускайте высыхания стекол на всех этапах выполнения методики. Препараты, высохшие во время процедуры, могут повысить фон.

7.4. 3,3’-диаминобензидин (DAB) классифицирован как подозреваемый канцероген с потенциальным риском необратимого действия. Исключите физический контакт с веществом, а также его продолжительное или многократное воздействие на организм. Очень рекомендуется работать в вытяжном шкафу. Не допускайте попадания в глаза, на кожу или на одежду. После работы с препаратом тщательно вымойте руки. Рабочие растворы DAB следует готовить согласно вкладышу в упаковку.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

7.5. Некоторые реагенты а наборе содержат азид натрия (NaN_3), который в чистом виде очень токсичен. Будучи проглоченным или проникнув через кожу, он может оказаться смертельным. Эти реагенты вредны и при вдыхании. Эти реагенты — опасные твердые вещества. Они вызывают раздражение кожи, глаз и дыхательных путей. Воздействуют на центральную нервную систему, почки и сердечно-сосудистую систему. Хотя азид натрия в тех концентрациях, в которых он находится в данном продукте, не классифицируется как опасный, накопившись, он может взаимодействовать со свинцовыми и медными деталями сантехнических устройств, образуя очень взрывоопасные азиды этих металлов. При уничтожении остатков азида натрия, смывайте их большим количеством воды, чтобы предотвратить его накопление в трубах.

7.6. Гематоксилин и синий краситель вредны при проглатывании. Гематоксилин и синий краситель раздражают глаза, кожу и дыхательные пути.

7.7. С образцами и со всеми веществами, контактировавшими с образцами, следует обращаться как с потенциальными источниками инфекции и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности. Категорически запрещается отбирать реагенты пипеткой при помощи рта. Не допускайте контакт реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. При контакте реагентов с чувствительными покровами обильно промойте их водой.

7.8. Минимизируйте микробное загрязнение реагентов для исключения неспецифического окрашивания.

7.9. Использование не рекомендованных периодов инкубирования, температурных режимов или методов может привести к получению ошибочных результатов.

7.10. Для оптимальной работоспособности реагенты должны быть разбавлены в соответствии с процедурой. Дальнейшее разбавление может привести к потере окрашивания антигена.

7.11. Компоненты тестового набора зависят от лота. Не заменяйте компоненты набора компонентами с другими номерами лота. Номералотов приводятся на этикетках упаковок.

7.12. Не используйте тестовый набор SurePath® с ProEx™ C после истечения срока его годности, напечатанного на упаковке. Пользователь должен провести валидацию условий, если реагенты хранятся без соблюдения условий, указанных в листовке-вкладыше в упаковке.

7.13. Не существует видимых признаков разложения данного продукта. Поэтому одновременно с анализом пациентских образцов должны быть проанализированы позитивный и негативный контроли. Если наблюдается неожидаемое окрашивание, которое не может быть объяснено отклонениями от лабораторных процедур, или есть подозрения, что в тестовом наборе SurePath™ с ProEx™ C имеются проблемы, обращайтесь к технической поддержке TriPath Imaging.

7.14. Пользуйтесь соответствующими средствами индивидуальной защиты, чтобы исключить контакт реагентов с глазами и кожей. Для получения дополнительной информации ознакомьтесь с Паспортом безопасности материала (MSDS).

7.15. Тест SurePath® с ProEx™ C предназначен для цитологических собранных в консервирующей жидкости SurePath®. Совместимость с обычными и монослойными препаратами, иными чем SurePath® не изучалась.

8. ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

8.1. Подготовка образца

8.1.1. Обратитесь к Руководству оператора по SurePath® PrepStain System за инструкциями относительно подготовки препаратов из остаточных цервикальных цитологических образцов SurePath®.

8.1.2. Добавьте 8 мл консервирующей жидкости SurePath® к остаточному образцу во флаконе с SurePath® (около 2 мл). Разбавленный образец должен быть обработан на BD PrepMate™ по стандартной методике и на PrepStain.

8.1.3. Подготовленные препараты SurePath® следует поместить в буфер для подготовки препаратов в SureDetect™ (Ознакомьтесь с инструкциями по приготовлению рабочего раствора для препаратов в SureDetect™ Slide Preparation Buffer 10X). Препараты должны оставаться в буфере по меньшей мере 1 hour, но не дольше 72 час перед иммуноцитохимией.

8.1.4. Для оптимальной работы метода следует выполнить процедуру демаскировки антигена. Эта процедура включает погружение приготовленных препаратов в рабочий раствор буфера для подготовки препаратов SureDetect™ минимум на 1 час при комнатной температуре, и затем нагревания препаратов в буфере предобработки до 95°C. Препараты выдерживают при 95°C в течение 15 мин, и затем дают им остыть до комнатной температуры в течение 20 мин. Рекомендуется использовать калиброванную водяную баню или овощной пропариватель, способный поддерживать требуемую температуру. Лаборатории, расположенные на больших высотах, должны выбрать наилучший способ поддержания необходимой температуры. Процесс окрашивания должен быть начат сразу после демаскировки антигена и охлаждения. Отклонения от описанной процедуры могут отрицательно сказаться на результатах.

8.2. Подготовка реагента

8.2.1. Перед окрашиванием приготовьте следующие реагенты.

8.2.2. Трис-буферный физиологический раствор с 0.05 % Tween 20 (TBST)

8.2.2.1. Приготовьте TBS согласно техническим требованиям производителя.

8.2.2.2. Добавьте Tween 20 до конечной концентрации 0,05 %, если он уже не присутствует в TBS.

8.2.3. Раствор субстрата-хромогена (DAB) (объем, достаточный для 5 препаратов)

8.2.3.1. Перенесите 1 мл DAB-субстратного буфера (флакон 4a) в тест-пробирку.

8.2.3.2. Добавьте 1 каплю (20 – 30µл) of DAB-хромогена (флакон 4b). Тщательно перемешайте и нанесите пипеткой на препараты.

8.2.3.3. Свежий раствор субстрата-хромогена готовьте ежедневно.

8.2.3.4. На качество окрашивания не влияет осадок, который может образоваться в растворе.

9. ПРОТОКОЛ ОКРАШИВАНИЯ (выполненного при температуре 20–25°C)

9.1. Примечания к процедуре окрашивания

9.1.1. Внимательно прочитайте все эти инструкции и познакомьтесь со всеми компонентами перед их использованием (см. Предосторожности).

9.1.2. Перед иммунным окрашиванием температура всех реагентов должна быть приведена к комнатной (20–25°C).

9.1.3. Все инкубирования следует проводить при комнатной температуре, если не указано иное.

9.1.4. Не допускайте высушивания препаратов на всех этапах процедуры окрашивания. Высохшие клеточные препараты могут окраситься неспецифически более интенсивно. Прикройте препараты, которые могут оказаться на сквозняке. При продолжительном инкубировании препараты следует поместить во влажную камеру.

9.2. Демаскировка антигена

9.2.1. Поместите приготовленные препараты в сосуд Коплина, содержащий рабочий раствор буфера приготовления препаратов SureDetect™ минимум на 1 час, максимум на 72 часа.

9.2.2. Инкубируйте на водяной бане или в пропаривателе 15 мин при 95°C.

9.2.3. Выньте из бани или пропаривателя сосуд Коплина целиком и дайте им остыть в буфере 20 мин.

9.2.4. Промойте препараты деионизованной H_2O и перенесите в чистый сосуд Коплина, содержащий TBST.

9.3. Блокирующий реагент

9.3.1. Слейте избыток буфера.

9.3.2. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.3.3. Добавьте 200 µл пероксидазного блокирующего реагента (флакон 1a) так, чтобы покрыть поверхность отложения клеток.

9.3.4. Инкубируйте в течение 5 минут (±1 минута).

9.3.5. Промойте препараты в TBST, в 3 сменах по 2 минуты в каждой.

9.4. Белковый блок

9.4.1. Слейте избыток буфера.

9.4.2. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.4.3. Добавьте 200µл белкового блока (флакон 1b), чтобы полностью покрыть поверхность отложения клеток.

9.4.4. Инкубируйте в течение 5 минут (±1 минута).

9.4.5. НЕ ПРОМЫВАЙТЕ.

9.5. Первичная смесь антител

9.5.1. Слейте избыток белкового блока.

9.5.2. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.5.3. Добавьте 200µл смеси антител ProEx™ C Ab (флакон 2), чтобы полностью покрыть поверхность отложения клеток.

9.5.4. Инкубируйте 30 мин при комнатной температуре.

9.5.5. Промойте каждый препарат индивидуально буфером TBST с помощью емкости для промывания (не направляя струи на поверхность отложения клеток). Загрузите препараты в штатив.

9.5.6. Промойте препараты в TBST, в 3 сменах по 2 минуты в каждой.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

9.6. Аналитическая химия

9.6.1. Слейте избыток буфера.

9.6.2. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.6.3. Добавьте 200µл реагента мышиного зонда (флакон 3a), чтобы полностью покрыть поверхность отложения клеток.

9.6.4. Инкубируйте 20 мин (±1 мин).

9.6.5. Промойте препараты в TBST, в 3 сменах по 2 минуты в каждой.

9.6.6. Слейте избыток буфера.

9.6.7. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.6.8. Добавьте 200 µl of полимерного реагента (флакон 3b), чтобы полностью покрыть поверхность отложения клеток.

9.6.9. IИнкубируйте в течение 20 мин (±1 мин).

9.6.10. Промойте препараты в буфере TBST, в 3 сменах по 2 минуты в каждой.

9.6.11. Слейте избыток буфера.

9.6.12. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.6.13. Добавьте 200µл раствора субстрата-хромогена (DAB), чтобы полностью покрыть поверхность отложения клеток.

9.6.14. Инкубируйте в течение 5 минут (±1 минута).

9.6.15. Промойте препараты 5 мин в деионизованной H_2O.

9.7. Контрастирующее окрашивание

9.7.1. Промойте препараты в TBST, в 1 смене 2 мин.

9.7.2. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.7.3. Добавьте 200µл контрастирующего красителя гематоксилина (флакон 5), чтобы полностью покрыть поверхность отложения клеток.

9.7.4. инкубируйте 1 мин (±10 с).

9.7.5. Промойте препараты в течение 3 минут в проточной H_2O.

9.7.6. Поместите препараты в подготовленную влажную камеру (заполненную смоченными водой хлопчатобумажными салфетками или марлей).

9.7.7. Подсините препараты, добавив 200µл синего красителя (флакон 6) в течение 1 мин (±10 с).

9.7.8. Повторите промывку проточной водой в течение 1 мин.

9.8. Заливка

9.8.1. Погрузите препараты в 95 % этанол на 1 минуту или путем 25 погружений.

9.8.2. Выдержите препараты поочередно в 4 емкостях с абсолютным спиртом по 1 минуте или по 25 погружений в каждую.

9.8.3. Промойте поочередно в 3 емкостях с ксилолом по 1 минуте или по 25 погружений в каждую.

9.8.4. Покройте препараты безводной устойчивой средой с использованием покровных стекол.

10. СТАБИЛЬНОСТЬ

10.1. Реагенты стабильны в невскрытых флаконах до истечения срока годности, указанного на флаконе, и при условии соблюдения рекомендованного температурного режима хранения.

10.2. После вскрытия флаконов реагенты сохраняют стабильность в течение тридцати дней, если хранятся при рекомендованном температурном режиме.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

11.1. Изменчивость результатов часто объясняется различиями в порядке обращения с образцами при отклонениях от рекомендованных процедур анализа. Для дополнительной информации обратитесь к предлагаемому руководству по контролю качества Института клинических и лабораторных стандартов, *Гарантия качества в иммуноцитохимии*.

11.2. SureDetect™ SiHa Cell Control доступен как позитивный контроль от TriPath Imaging, Inc. Каждый флакон содержит клетки штамма рака шейки матки, которые обработаны подобно клиническим образцам. В качества негативного контроля можно использовать универсальный мышиный IgG негативный контроль. Препараты негативного и позитивного контроля должны быть включены в каждую процедуру окрашивания. Результаты окрашивания следует использовать как показатель действенности цикла анализа.

12. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ

12.1. Образцы, полученные от пациентов и контрольные образцы. Цитотехнолог или патолог должны оценивать окрашенные препараты с помощью светового микроскопа. Клетки можно рассматривать вручную или хранить в электронной галерее изображений, полученных под световым микроскопом.

12.2. Контрольные препараты: Позитивные и негативные контроли должны быть проверены прежде, чем рассматривать пациентские образцы, чтобы убедиться, что все реагенты действуют нормально. Присутствие бурого продукта реакции (3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида, DAB)в ядрах клеток SiHa контрольного препарата, окрашенного в тесте SurePath™ с ProEx™ C указывает на положительную реакцию. Контрольные препараты универсального мышиного IgG негативного контроля, окрашенные в тесте SurePath™ с ProEx™ C не должны иметь бурой окраски ядер и должны показывать только окраску контрастирующего красителя гематоксилина.

12.3. Оценка препаратов — 4-стадийный процесс.

Стадия 1: Адекватен ли образец?
В публикации Bethesda System (TBS) for Reporting Cervical Cytology (2-й вып.) утверждается: “Адекватный жидкостной препарат должен иметь по меньшей мере 5000 хорошо визуализированных / хорошо сохранившихся чешуйчатых клеток”. Эти критерии можно приложить к препаратам SurePath™ с ProEx™ C. Однако, как и с рутинным препаратом по Папаниколау, любой образец с аномальными клетками, который проявляет позитивную молекулярную реакцию, по определению удовлетворителен для оценки. Если ответ на этой стадии “да”, переходите к следующей стадии, если ответ “нет”, то результат — ***Неудовлетворительный для оценки***.

Стадия 2. Находится ли между умеренным и интенсивным бурое ядерное окрашивание в эпителиальных клетках?
Чтобы ответить “да” на этой стадии, ищите бурое окрашивание, которое легко визуализируется. Если бурое окрашивание слабое или “розовое”, по-видимому оно недостаточно, чтобы интерпретировать его как положительное. Если бурой окраски не видно, результат сообщается как ***Отрицательный***. Если адекватное бурое окрашивание визуализировано, переходите к следующей стадии.

Стадия 3: Чешуйчатая или грандулярная клетка, имеющая бурую окраску ядра? Если ответ да, переходите к следующей стадии. Если нет, то результат теста ***Отрицательный***.

Step 4: Являются ли клетка ≥ ASC (атипичная чешуйчатая клетка) или AGC (атипичная грандулярная клетка)?
Примените те же морфологические критерии, которые описаны в The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) для определения, является ли чешуйчатая клетка, содержащая бурые ядра ≥ ASC (атипичные чешуйчатые клетки). Если клетку можно считать ≥ASC (или ≥AGC), тогда результат теста ***Положительный***. Это включает ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL и рак. Если клетка по виду грандулярнвя, для определения, является ли клетка ≥ AGC (атипичные грандулярные клетки), применяется критерий TBS. Это включает эндоцервикальные AGC, эндометриальные AGC, AIS, и аденокарцинома. Если рассматриваемая клетка соответствует с NILM (негативна по интраэпителиальным повреждениям или злокачественности), то результат теста ***Отрицательный***.

13. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Wright TC, Schiffman M, Solomn D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C and Saslow D. Interim Guidance for the Use of Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cervical Cytology for Screening. Obstet. Gynecol. 2004. 102:304-309.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.

Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd Edition. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Timothy J. O'Leary, M.D. Ph.D. Quality Assurance for Immunocytochemistry; Approved Guideline (1999), MM4-A.

14. ГЛОССАРИЙ СИМВОЛОВ

REF	Номер по каталогу
IVD	Для диагностики *В пробирке*
	Ознакомьтесь с инструкциями по использованию
Σ	Содержит 75 тестов
	Внимание, ознакомьтесь с сопроводительной документацией
	Ограничения температуры хранения
LOT	Код серии
	Используйте формат ГГГГ-ММ-ДД или ГГГГ-ММ
	Производитель

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12

СЛУЖБА ТЕХНИЧЕСКОЙ ПОДДЕРЖКИ
США
Technical Service & Support
BD Diagnostics-Diagnostic Systems
www.bd.com/ds
technical_services@bd.com

1-800-638-8663

TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA

EC REP

Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ireland

CE

Разработан с использованием технологии от Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM™

и MILLENNIUM™ являются торговыми марками компании Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

Реагенты детекции поставлены

BioCare Medical
2940 Camino Diablo, Suite 300
Walnut Creek, CA 94596

SurePath® — это продукт и зарегистрированная торговая марка TriPath Imaging, Inc.
ProEx, SureDetect, PrepStain, PrepMate — продукты и зарегистрированные торговые марки TriPath Imaging, Inc.

©2013 TriPath Imaging, Inc. All rights reserved.
779-05848-10(08) 2013-12